



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

OL
RGT
13T

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD

PCT

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

09-32342

54. TÍTULO

METODOS PARA SEPARACION DE CELULAS DE ESPERMA Y COMPOSICIONES QUE CONTIENEN APTAMEROS O SECUENCIAS DE ACIDO NUCLEICO PARA USO EN ELLOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

BIOCERN, INC.

DOMICILIO

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

22. BOGOTÁ, D. C.,

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-032342- -00000-0000

Fecha: 2009-03-30 14:43:09 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 154

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

1

ENTRADA EN FASE NACIONAL

2

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☒ Capítulo I☐ Capítulo II3
(71)

SOLICITANTE

Nombre: BIOCERN, INC.

Dirección: 92 Adam Way, Atherton, CA 94027, ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA

Nacionalidad o domicilio: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Lugar de Constitución: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual: _____

Número:

4

REPRESENTANTE
O
5
DERADO

Nombre: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

Dirección: Avda. Carrera 24 No. 37 - 31 Of. 202
BOGOTA D.C., COLOMBIA

Teléfono: 2444096

Fax: 2442496

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.

X

NIT

C.E.

Otro

Cuál

Número: 19.270.955 T.P. 43.308 C.S.J.
BOGOTAINVENTOR (ES)
(72)

7

Nombre: OKSENBERG, David A.; KRYLOV, Sergey; y MUSHEEV, Michael

Dirección: 92 Adam Way, Atherton, CA 94027 E.U.A.; 45 Quaker Ridge Road Concord, Ontario L4K
CANADA; y 775 Steeles Ave W., Apt.1504, North York, Ontario M2R 2S8, CANADA

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE Y CANADIENSES RESPECTIVAMENTE

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/077300

Fecha: 30-08-07

Publicacion Internacional No. WO 2008/028081 A2

Fecha: 06 - 03 - 08

8

Título (54)

**MÉTODOS PARA SEPARACIÓN DE CÉLULAS DE ESPERMA Y COMPOSICIONES QUE
CONTIENEN APTÁMEROS O SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO PARA USO EN ELLOS**

(Folio 161) - 7

Clasificación internacional (51)

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI

X

NO

US

30/08/2006

60/824,069

Comprobante de pago No.

Fecha:

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

2

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12X12 cm.
- ☐ De ser el caso, información de otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas total o parcialmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional, Nuevas Reivindicaciones
- ☒ Otros: Informe de Búsqueda de Antecedentes Internacional junto con la traducción
- ☒ Publicación Internacional No. WO/2008/028081 A2

FIGURA CARACTERISTICA

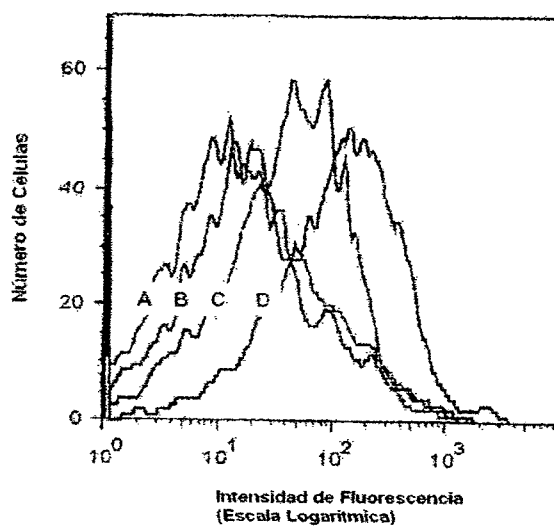


FIGURA 1

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

FIRMA:

C.C. 19.270.955 BOGOTÁ T.P. 43.308 C.S.J.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 March 2008 (06.03.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/028081 A2

- (51) International Patent Classification:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2007/077300
- (22) International Filing Date: 30 August 2007 (30.08.2007)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/824,069 30 August 2006 (30.08.2006) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIO-
CERN, INC. [US/US]; 92 Adam Way, Atherton, CA
94027 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): OKSENBERG,
David, A. [US/US]; c/o BIOCERN, INC., 92 Adam Way,
Atherton, CA 94027 (US). KRYLOV, Sergey [CA/CA];
45 Quaker Ridge Road, Concord, Ontario L4K (CA).
MUSHEEV, Michael [CA/CA]; 775 Steeles Ave W., Apt.
1504, North York, Ontario M2R 2S8 (CA).
- (74) Agents: HULEATT, Jayme, A. et al.; Cooley Godward
Kronish LLP, 1200 19th Street, N.W., Suite 500, Washing-
ton, DC 20036 (US).

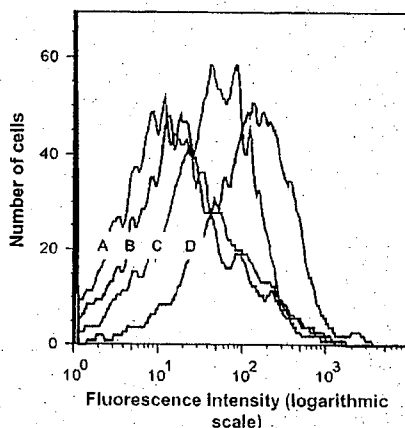
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: SPERM CELL SEPARATION METHODS AND COMPOSITIONS CONTAINING APTAMERS OR NUCLEIC ACID
SEQUENCES FOR USE THEREIN



(57) Abstract: The present invention provides an aptamer or pool of aptamers that bind(s) to a target molecule on the surface of a mammalian sperm cell and a method for producing the aptamers. The method comprises contacting a collection of different nucleic acid molecules with the target molecule under conditions favorable for binding between at least one of the nucleic acid molecules and the target molecule, to form at least one complex comprising the nucleic acid molecule bound to the target molecule, wherein each of the nucleic acid molecules comprises at least one segment of randomized nucleotide sequences. The complexes are then separated from the unbound nucleic acid molecules and unbound target molecules, and the bound nucleic acid molecule is recovered from the separated complex. The aptamers are used to separate sperm cells based upon sperm cell qualities, such as whether the cells contain X chromosomes or Y chromosomes.



— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

**SPERM CELL SEPARATION METHODS AND COMPOSITIONS
CONTAINING APTAMERS OR NUCLEIC ACID SEQUENCES
FOR USE THEREIN**

RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims priority to U.S. Provisional Patent Application No. 60/824,069, filed August 30, 2006, which is herein incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention relates to methods and compositions for identifying and separating cells from a population of cells, particularly, mammalian sperm cells through the use of nucleic acids, particularly aptamers, that specifically bind with high affinity and specificity or preferentiality to either sperm cells containing the X chromosome or the Y chromosome.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] The ability to select sperm cells having desired characteristics remains an important objective in artificial reproduction. An efficient and cost effective process for identifying and separating sperm cells for sex selection would have significant economic implications for the livestock industry and in particular in the beef and dairy industry. For instance, in the beef industry, male bulls have greater commercial value than female cattle because of their size, so methods that allow for enrichment of male bulls would provide a clear competitive advantage to ranchers who use such techniques. On the other hand, in the dairy industry, milk-producing cows are generally more desirable. Currently however, only a small percentage of cattle ranchers employ artificial insemination methods involving sex-specific sperm cells as a means to produce livestock having the desired sex. Despite the advantages of being able to control and plan the sexual makeup of an inventory of cattle, such an approach is not more widely used in the industry because current methods for sorting sperm cells into sex-specific sperm cells, which employ flow cytometry techniques, are both

expensive and involve irreversible staining of the sperm cells prior to insemination. Less costly and intrusive methods for identifying and separating sperm cells based on sperm cell quality, physical characteristics, or content would also have important applications in many animal and human reproductive technologies.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0004] The present invention provides at least one aptamer or nucleic acid sequence that binds to a target molecule accessible from the surface of a cell, particularly, a mammalian sperm cell and a method for producing the aptamers or nucleic acid sequence. The method comprises contacting a collection of different nucleic acid molecules with the target molecule under conditions favorable for binding between at least one of the nucleic acid molecules and the target molecule, to form at least one complex comprising the nucleic acid molecule bound to the target molecule, wherein each of the nucleic acid molecules comprises at least one segment of randomized nucleotide sequences. The complexes are then separated from the unbound nucleic acid molecules and unbound target molecules, and the bound nucleic acid molecule is recovered from the separated complex.

[0005] The present invention further provides one or more specific nucleic acid molecules or aptamers, preferably an oligonucleotide, more preferably a DNA molecule, that binds preferentially to either a sperm cell containing a X-chromosome (hereinafter referred to as a "X sperm cell") or a sperm cell containing a Y-chromosome (hereinafter referred to as a "Y sperm cell"), and preferably preferentially binds better to one of the X sperm cells or binds with significantly different affinities to each type of X and Y sperm cells.

[0006] The present invention also provides an isolated non-naturally occurring nucleic acid sequence or aptamer that binds to a target molecule on a mammalian sperm cell comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of: a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 3-35 or a target molecule binding portion thereof.

[0007] The present invention also provides a method for using the aptamers or nucleic acid sequence to identify, select and separate X and Y sperm cells. Preferably, the method comprises separating the mammalian sperm cells by contacting the X and Y sperm cells with at least one aptamer of the invention and separating the cells into two or more populations based upon their ability to preferentially bind to the aptamer.

[0008] The invention further includes the X and Y sperm cell population(s) produced by the separation method. The invention further comprises an artificial insemination kit comprising the sperm cell population produced by the method of the invention, and a method for artificial insemination of a mammal by administering the selected sperm cell population to the mammal.

[0009] The present invention also provides diagnostic and technological means relating to sperm cell qualities such as sperm cell viability, motility, functionality, stimulation, and preservation, as well as diagnostic and technological means that address insemination rates, fertilization rates, and birth rates of desirable offspring, by establishing a method of selectively sorting semen or sperm cells obtained from various species, individuals, and specimens.

DETAILED DESCRIPTION OF THE FIGURES

[0010] **Figure 1** is a flow cytometry graph showing the specificity of DNA aptamer pools to live sorted bull spermatozoa after 9 aptamer selection rounds (A = Y sorted bull semen cells binding to a naïve DNA library; B = Y sorted bull semen cells binding to the X cell specific aptamer pool; C = X sorted bull semen cells binding to a naïve DNA library; and D = X sorted bull semen cells binding to the X cell specific aptamer pool).

[0011] **Figure 2A** shows the binding analysis of the enriched X-cells specific aptamer pool. Fluorescence confocal images of sperm cells (Left); and optical images of sperm cells (Right). (a) X-specific aptamer pool with the X cells, (b) X-specific aptamer pool with the Y cells; (c) Naïve DNA library with X cells.

[0012] **Figure 2B** shows the binding analysis of the enriched Y-cells specific aptamer pool. Fluorescence confocal images of sperm cells (Left); and Optical images of sperm cells (Right). (a) Y- specific aptamer pool with the Y cells, (b) Y-specific aptamer pool with the X cells; (c) Naïve DNA library with Y cells.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0013] Within the context of the present invention, aptamers are defined as a class of ligands or nucleic acid sequences, the terms of which are used interchangeably throughout this specification; also are referred to as oligomers or oligonucleotides, *i.e.*, nucleic acids that bind preferentially to a particular target molecule, such as a polypeptide, a short peptide, an enzyme, a protein, a lipid, a glycolipid, a phospholipid, a glycoprotein, a carbohydrate, a small molecule or a cell surface molecule, such as a receptor, an extracellular matrix or scaffolding molecule or an ion channel. The aptamers of the present invention are ligands or single-stranded oligonucleotides that bind with high affinity and specificity to target molecules through complementary shape interactions. The aptamers or nucleic acid sequences of the present invention are capable of binding or forming a complex with a target molecule to a higher degree or affinity than the aptamer would bind to contaminating or control molecules that presumably do not contain the target on the surface of or accessible from the surface of a X or Y sperm cells. The aptamers or nucleic acid sequences of the present invention may bind preferentially to a target molecule on the surface of the X sperm cell as compared to the Y sperm cell or vice versa. The nucleic acids may be either DNA, RNA, single-stranded or double-stranded, and any chemical modifications thereof. Modifications include, but are not limited to, those that provide other chemical groups that incorporate additional charge, polarizability, hydrogen bonding, electrostatic interaction, fluxionality or a label to the nucleic acid bases or to the nucleic acid molecule as a whole. Preferably, the aptamers are DNA molecules. Most preferably, they are oligonucleotides.

[0014] The length of these molecules is more than one nucleotide and may include short sequences, such as dimers or trimers, that may be intermediates in the production of specific nucleic acid molecules that bind to a target. Aptamers of the present invention include nucleic acid molecules of any length but preferably less than 200 nucleotides, preferably less than 150 nucleotides, preferably less than 100 nucleotides, preferably less than 80 nucleotides, more preferably less than 60 nucleotides, more preferably less than 40 nucleotides, preferably less than 35 nucleotides, preferably less than 30 nucleotides, preferably less than 25 nucleotides, preferably less than 20 nucleotides, preferably less than 15 nucleotides and preferably less than 10 nucleotides. Typically, such oligonucleotides are about 15-60 nucleotides long.

[0015] Within the context of the present invention, aptamers are understood to include both monoclonal aptamers and polyclonal aptamers. As used herein, monoclonal aptamers are ones with the same nucleotide sequences that bind to the same target, and polyclonal aptamers are ones with some variation in nucleotide sequences, which bind to the same target. Monoclonal aptamers are preferred. As used herein, an aptamer, preferably is an oligonucleotide that is capable of complexing or binding to a target molecule as described herein. The affinity or complexation of an aptamer to its target molecule is a matter of degree and is measured by the ability of the aptamer to bind to the target molecule at a higher degree than to a control or contaminating molecules. Thus, specificity of aptamers is similar in meaning to the specificity as it applies to antibodies.

[0016] Once useful aptamers that bind to but preferentially to either of the X sperm cells or the Y sperm cells are identified by one of the methods disclosed herein, the aptamers can be prepared by any known method of producing nucleic acid molecules, such as synthetic, recombinant and purification methods. Additionally, the aptamers may be linked to another molecule to assist with the detection and/or isolation after contacting the aptamer to the sperm cell. It is important that this additional molecule would not significantly affect or interfere with the binding affinity of the aptamer to the target molecule. Useful labels would include labels known to be useful for isolation

and detection of proteins, peptides, metabolites and antibodies, such as fluorescent or biotin moieties or magnetic beads or other types of beads useful for isolation.

[0017] Aptamers or nucleic acid sequences of the present invention can be used alone or in combination with other aptamers specific for the same target molecule. Different aptamers that contain the same consensus would be known from the comparison of two or more known aptamers to a specific target molecule or possibly another target molecule on or near the surface of an X or Y sperm cell. If X and Y sperm cells are to be separated, it is important to employ one or more aptamers specific or preferential for one cell or the other to provide the best separation to obtain a sperm population of either X containing or Y containing sperm cells.

[0018] Aptamers for sperm cell surface proteins or other sperm cell surface targets (including, but not limited to, carbohydrates, lipids, nucleotides and other small molecules that may be accessible to bind to specific aptamers) are identified and selected by the methods of the invention. In one embodiment, the invention provides a method for producing an aptamer that binds to a target molecule on the surface of a mammalian sperm cell. A collection of different nucleic acid molecules is contacted with a target molecule that is accessible for binding to these molecules, likely on the cell surface or protruding from the cell surface, under conditions favorable for binding between at least one of the nucleic acid molecules and the target molecule. Each of the nucleic acid molecules contains at least one segment of randomized nucleotide sequences. This provides variation in the nucleic acid molecules. The contact results in the formation of at least one complex comprising at least one nucleic acid molecule bound to the target molecule. The complexes are then separated from the unbound nucleic acid molecules and the unbound target molecules. Then, the bound nucleic acid molecule is recovered from the separated complex, thus providing the desired aptamer. In a further embodiment, the method comprises the further step of amplifying the recovered nucleic acid molecules to create additional molecules. In a further, preferred embodiment, the recovered and amplified molecules, *i.e.*, aptamers, are further mixed with the collection of X and Y sperm cells containing target molecules accessible for

binding, preferably on or accessible from the cell surface and the sequence of steps stated above is repeated a sufficient number of times until aptamers of a desired specificity/preferentiality and binding affinity are recovered. The aptamers bind more specifically with a target molecule on a cell as compared to a control pool of DNA sequences to the same cell. In an alternative embodiment, the contacting step comprises incubating the molecules to form an equilibrium mixture and the separating step comprises capillary electrophoresis.

[0019] Preferably, the target molecule on the surface of a cell is one that is unique to either a X sperm cell or a Y sperm cell and that will not cross react with each type of cell. Such a target molecule, can be a protein, a peptide, an enzyme, a lipid, a glycolipid, a phospholipid, a glycoprotein, a carbohydrate, a small molecule or a cell surface molecule, such as a receptor, an extracellular matrix or scaffolding molecule or an ion channel. Most preferably, the protein distinguishes X sperm cells from Y sperm cells containing a Y chromosome.

[0020] In one embodiment of the invention, the methods of the invention are performed in an iterative fashion such that there are repeated steps of (a) contacting a collection of different nucleic acids (*i.e.*, aptamers) with a target molecule accessible from the surface of a cell to form at least one complex comprising at least one nucleic acid molecule bound to a target molecule accessible from the surface of a cell, (b) separating the complexes from unbound nucleic acid molecules and unbound target molecules; and (c) recovering the bound nucleic acid molecule from the separated complex. In this embodiment, a plurality of aptamers recovered from the separated complex of step (c) are used in a subsequent round of the method in step (a). In one embodiment of the invention, the steps of the sorting sperm cells (*i.e.*, steps (a), (b) and (c) above) are repeated 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, 10 or more, or 11 or more times to produce an aptamer pool specific for X sperm cells or Y sperm cells. Sorted aptamers can be purified by methods known in the art and sequenced by known methods or a commercial vendor.

[0021] Representative aptamers produced by the method disclosed herein comprise an isolated non-naturally occurring nucleic acid sequence that binds to a target molecule on a mammalian sperm cell comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- (a) a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 3-35 or a target molecule binding portion thereof;
- (b) a nucleotide sequence which is substantially homologous to and has substantially the same ability to bind said target molecule on said sperm cell as the nucleotide sequence of (a) or a target molecule binding portion thereof; and
- (c) a nucleotide sequence having substantially the same structure and has substantially the same ability to bind said target molecule on said sperm cell as the nucleotide sequence of (a) or (b) or a target molecule binding portion thereof.

[0022] The isolated non-naturally occurring nucleic acid sequence as described above also encompasses at least a portion of nucleotides 1-20 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-35 or a target molecule binding portion thereof; at least a portion of nucleotides 61-80 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-10 and 12-35 or nucleotides 44-63 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof; at least a portion of nucleotides 1-20 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-35 and/or wherein at least a portion of nucleotides 61-80 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-10 or 12-35 or nucleotides 44-63 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof; and DNA sequences comprises nucleotides 21-60 of SEQ ID NOS: 3-10 or 12-35 or nucleotides 21-43 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof.

[0023] The present invention also encompasses a composition comprising at least one of the nucleic acid sequences selected from the group consisting of all of the nucleic acid sequences enumerated in [0020] and [0021] above.

[0024] The present method further comprises the step of amplifying the recovered nucleic acid molecule to create additional nucleic acid molecules. The contacting step

(a) may comprise incubating the molecules to form an equilibrium mixture and wherein the separating step comprises capillary electrophoresis.

[0025] The present method further comprises incubating the collection of different nucleic acid molecules or aptamers after each round and sperm cells containing the target molecule with a primer that is substantially complementary to template nucleic acid sequence. The template nucleic acid sequence is a sequence that corresponds to a segment of the aptamer that is unvaried (or constant) within a plurality of aptamers. The aptamer preferably is from a DNA library and this template nucleic acid sequence is a vector sequence. The contacting step (a) further comprises a negative selection step followed by a positive selection step. The plurality of the recovered aptamers are quantified using the know technique of flow cytometry.

[0026] The target molecule on the sperm cell to which the aptamer can bind is selected from the group consisting of a protein, a peptide, an enzyme, a lipid, a glycolipid, a phospholipid, a glycoprotein, a carbohydrate, a small molecule or a cell surface molecule. In a preferred embodiment the target molecule is a target molecule contained on a sperm cell and the target molecule distinguishes at least one X sperm cell from at least one Y sperm cell by a comparison of the binding or no binding or differential binding. The sperm cells identified by this method are cattle sperm cells or human sperm cells.

[0027] Aptamers that specifically bind to sperms cells can be identified by methods known in the art, including, but not limited to cell sorting and flow cytometry techniques. The present method provides a method of preparing aptamers that permits separation of mammalian X sperm cells from mammalian Y sperm cells, wherein the method produces a first group of aptamers that bind to X sperm cells in the first sample and a second group of aptamers that bind to Y sperm cells in the second sample; and the method further comprises: (d) comparing the first and second groups of aptamers to identify by process elimination at least one aptamer that binds only to either the X

14

sperm cells or the Y sperm cells. The first and second samples of mammalian sperm cells are produced by flow cytometry and cell sorting.

[0028] The method of preparing sperm specific aptamers further comprises a contacting step (a) which further comprises: (a1) contacting a first collection of different nucleic acid molecules with a target molecule contained in a first sample of mammalian X sperm cells under conditions favorable for binding between the nucleic acid molecules and the X sperm cells to form at least one complex comprising at least one nucleic acid molecule bound to at least one X sperm cell, wherein each of the nucleic acid molecules comprises at least one segment of randomized nucleotide sequences; and (a2) contacting a second collection of different nucleic acid molecules with a target molecule contained in a second sample of mammalian Y sperm cells under conditions favorable for binding between the nucleic acid molecules and the Y sperm cells to form at least one complex comprising at least one nucleic acid molecules bound to at least one Y sperm cell, wherein each of the nucleic acid molecules comprises at least one segment of randomized nucleotide sequences; wherein the separation step (b) and the recovery step (c) thereby produces aptamers for X sperm cells and aptamers for Y sperm cells. The aptamers recovered by this method are those that bind to X sperm cells and those that bind to Y sperm cells.

[0029] The method of producing sperm specific aptamers further comprises that prior to step (a), at least 1 round of contact of the nucleic acid molecules with an unsorted cell population comprising both mammalian X sperm cells and Y sperm cells occurs. Also the separating step (b) further comprises the step of separating the sperm cells bound to the aptamer from the aptamer and the recovering step (c) further comprises recovering the separated sperm cells. The mammalian sperm cells preferably are cattle sperm cells or human sperm cells.

[0030] In one embodiment of the invention, rounds of unsorted aptamer selection can be performed prior to rounds of sorted X and Y sperm cell/aptamer selection. For instance, 1 to 5 rounds of unsorted aptamer selection can be performed. The invention

includes methods comprising 3 rounds of unsorted aptamer selection prior to rounds of sorted aptamer selection. The method of claim 1, further comprises incubating the collection of different nucleic acid molecules and the target molecule with a primer that is substantially complementary to template nucleic acid sequence.

[0031] In an alternative and preferred embodiment, the invention provides a method for producing an aptamer that permits separation of X sperm cells from Y sperm cells. A first sample of X sperm cells is obtained, and a second sample of Y sperm cells is obtained. A first group of aptamers are produced, which bind to the X sperm cells in the first sample, and a second group of aptamers are produced that bind to the Y sperm cells in the second sample. The first and second groups of aptamers are compared to identify by a process of elimination at least one aptamer that binds to either of the X sperm cells or the Y sperm cells. Generally, several different aptamers are identified that bind to either type of cells.

[0032] Preferably, the first and second samples of mammalian sperm cells, which contain either Y sperm cells or X sperm cells are produced by flow cytometry and cell sorting techniques that are known to those skilled in the art. Such techniques are disclosed in U.S. Patent No. 5,135,759, issued August 4, 1992. Generally, a flow cytometer measures the amount of fluorescent light given off when the sperm, previously treated with a fluorescent dye, passes through a laser beam. The dye binds to the DNA. Because the X chromosome contains more DNA than the Y chromosome, the female (X) sperm takes up more dye and gives off more fluorescent light than the male (Y) sperm. To detect the small differences in DNA between the X and the Y sperm, the sperm passes single file through the laser beam, which measures the DNA content of individual sperm. This permits separation of the individual X and Y sperm cells by a cell sorter. Sorted X and Y sperm cells can be purchased from commercial sources which have been sorted using similar cell sorting methods.

[0033] Preferably, the aptamers are produced by a process comprising the steps of: (a) contacting a first collection of different nucleic acid molecules with a first sample of Y

16

sperm cells under conditions favorable for binding between the nucleic acid molecules and the Y sperm cells to form at least one complex comprising at least one nucleic acid molecule bound to at least one Y chromosome-bearing sperm cell, wherein each of the nucleic acid molecules comprises at least one segment of randomized nucleotide sequences; (b) contacting a second collection of different nucleic acid molecules with the second sample of X sperm cells under conditions favorable for binding between the nucleic acid molecules and the X sperm cells to form at least one complex comprising at least one nucleic acid molecule bound to at least one X sperm cell, wherein each of the nucleic acid molecules comprises at least one segment of randomized nucleotide sequences; (c) separating the complexes from the unbound nucleic acid molecules and unbound target molecules; and (d) recovering the bound nucleic acid molecules from the complexes, thereby producing aptamers for Y sperm cells and aptamers for X sperm cells.

[0034] In a preferred embodiment, the aptamers are tested and validated by contacting them with a sample of sperm cells containing X sperm cells and Y sperm cells, separating the sperm cells by flow cytometry and cell sorting, and determining that the putative X-binding aptamer binds to the X sperm cell and the putative Y-binding aptamer binds to the Y sperm cell. Generally, the aptamers are labeled, for example, with a fluorescent moiety to permit the appropriate identification.

[0035] In producing the aptamers of the invention various specific techniques known to those skilled in the art may be used. One such technique is the MonoLex process of AptiRes, Luckenwalde, Germany. The process involves the steps of: (1) synthesis of an oligonucleotide library with regions of random sequence; (2) affinity adsorption of the oligonucleotides to a target; (3) affinity sorting of the oligonucleotides along an affinity resin; (4) separation of the oligonucleotides with different levels of affinity into numerous pools comprising multiple aptamers per pool; (5) amplification of the separated nucleotide pools (which produces polyclonal aptamers); and (6) identification of individual oligonucleotides by cloning and sequencing (which produces monoclonal aptamers).

[0036] Another technique is known as the SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) process. The SELEX process and variants thereof are described in U.S. Patent Nos. 5,861,254; 6,261,774 B1; 6,376,190 B1; 6,506,887 B1; 6,706,482 B2 and 6,730,482 B2. This process includes the steps of: (1) contacting a mixture of nucleic acids, preferably comprising segments of randomized sequences, with a target under conditions favorable for binding; (2) partitioning unbound nucleic acids from those nucleic acids that have bound specifically to target molecules; (3) disassociating the nucleic acid-target complexes; (4) amplifying the nucleic acids disassociated from the nucleic acid-target complexes to yield a ligand-enriched mixture of nucleic acids; and (5) repeating the previous steps through as many cycles as desired or necessary to yield highly specific, high affinity aptamers to the target molecule.

[0037] A related process is the CE-SELEX (capillary electrophoresis-SELEX) process as described in J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 20-21. This technique uses electrophoresis to separate binding sequences from inactive ones. Selection occurs in free solution. Active sequences that bind the target undergo a mobility shift, similar to that seen in affinity capillary electrophoresis. Active sequences are separated from inactive sequences and collected as separate fractions.

[0038] A preferred method for identifying and isolating aptamers is the NECEEM (NonEquilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures) process as described in J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 13674-13675, Anal. Chem. 2003, 75, 1382-1386, Krylov, "NECEEM for Development, Characterization and Analytical Utilization of Aptamers," Lab Plus International, November 2005, and Krylov, "Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures (NECEEM): A Novel Method for Biological Screening," J. Biomol. Screen Online First, January 17, 2006.

[0039] Briefly, this method starts with a naive DNA library (every sequence is statistically unique) that is mixed with the target protein and incubated to form an equilibrium mixture. DNA molecules with high affinity bind to the target protein, while those with low affinity do not bind. A plug of the equilibrium mixture is then

18

introduced into a capillary, and a high voltage is applied. The equilibrium fraction of DNA-target is separated from the equilibrium fraction of DNA by gel-free capillary electrophoresis under non-equilibrium conditions. Under these conditions, the mobility of the target is higher than that of DNA, and the mobility of the target-DNA complex is typically intermediate between that of the DNA and the target. In the electric field, the zones are thus separated, and equilibrium between the three components is no longer maintained. The DNA-target complex starts disassociating, which results in "smears" of DNA and target between three peaks. Due to the high efficiency of separation, reattachment of disassociated DNA and target is negligible.

[0040] The components reach the end of the capillary in the following order: (1) the equilibrium part of free target; (2) free target formed by disassociation of DNA-target during NECEEM; (3) the remains of intact DNA-target; (4) free DNA formed from the disassociation of DNA-target during NECEEM; and (5) the equilibrium part of free DNA. A fraction is collected from the output of the capillary in a time window. The widest aptamer collection window includes DNA-target complexes and DNA disassociated from DNA-target complexes during NECEEM.

[0041] The preferred targets are polypeptides (peptides and proteins) on the sperm cells that are sex-specific or otherwise allow identification or separation of the sperm based on sex selection or other desired characteristics. Examples of such polypeptides are disclosed in U.S. Pat. Nos. 4,191,749; 4,448,767; 5,021,244; 6,153,373; and 6,489,092 and in U.S. Patent Application Publication 2003/0162238 A1. For example, the published patent application discloses an isolated sex-chromosome-specific protein characterized as follows: (a) X chromosome specific, (b) associated with the cell membrane of bovine sperm cells, and (c) having a molecular weight on SDS-PAGE of about 32 kDa.

[0042] Once suitable aptamers are selected, they may be produced and reproduced by many techniques well known to those of ordinary skill in the art, including enzymatic techniques or through chemical synthesis. Additional chemical groups may be added

10

through known chemical techniques. Such groups include fluorescein or biotin and other groups that create a detectable signal. In addition, modified nucleotides may be used to protect the aptamers from degradation by nucleases. Such modified nucleotides include 2'-O-methyl and 2'-fluoro derivatives.

[0043] In some embodiments, the aptamers selected and/or produced as described above will be used in an assay for separating populations of sperm cells based on whether they carry the X or Y chromosome, an abnormal number of sex chromosomes, or other desired sperm cell characteristics. In a preferred embodiment, the method of separating mammalian sperm cells comprises the steps of: 1) contacting the mammalian sperm cells with the aptamer of the invention and 2) separating the sperm cells into two or more populations based on the ability of the sperm cells to bind to the aptamer. In one embodiment, the method comprises the further step of separating the sperm cells bound to the aptamer from the aptamer and recovering the separated sperm cells. In another embodiment, the sperm cells that are not bound to the aptamer are recovered.

[0044] In an alternative embodiment, more than one type of aptamer may be used. Thus, two or more aptamers of the invention may be used in the separation method and these aptamers may contain consensus sequences that bind to the same target molecule. Aptamers produced by the present method are useful for binding to target molecules and more specifically those target molecules on sperm cells, both X sperm cells and Y sperm cells.

[0045] This method produces sperm cell populations selected and separated based upon certain desired characteristics of the cells. Separated populations may be bound or unbound to the aptamer. If the desired population is bound to the aptamer, preferably the sperm cells are separated from the aptamer molecules. Preferably, the sperm cells are cattle sperm cells. In one preferred embodiment, the sperm cells contain a Y chromosome. In an alternative preferred embodiment, the sperm cells contain only the X chromosome.

[0046] In a further embodiment, the invention provides a method for producing an aptamer or nucleic acid sequence that permits separation of X sperm cells from Y sperm cells. This prepared aptamer is contacted with a mixed population of X and Y sperm cells, and the aptamer binds preferentially to the X sperm cells and these bound aptamer-X sperm cell complexes are separated from the original mixed sperm cell population leaving a Y containing rich sperm cell population. The bound aptamer-X containing sperm cell complex can be treated to release the X containing sperm cells so that they can be isolated as a population of cells.

[0047] An assay for separating sperm cells by use of aptamers could be used, for example, as follows. Commercially available, microscopically small magnetic beads are coated with an appropriate aptamer of the invention, such as X sperm specific aptamers. These beads will be placed in a suspension of the sperm-cells in an appropriate receptacle, such as a glass dish. Because the sex-chromosome-specific proteins are present on the cell surface, the X sperm cells will then bind to the X sperm specific/preferential aptamer on the beads, while the Y sperm cells will not or will bind less preferentially. The beads are then pulled to the side of the dish using a magnet. Sperm cells having the Y chromosome are then recovered. Other types of beads that can be used to capture and recover the aptamers may also be used. Additional techniques using magnetic beads coated with substances that bind to sperm cells are disclosed in U.S. Patent Application Publication Nos. 2003/0068654 A1, 2004/0142384 A1, and 2005/0114915 A1.

[0048] In another example, agglutination of sperm cells may be used. In such an approach, live, unsorted sperm may be suspended in a serum free, *in vitro* culture medium and exposed to either Y or X sperm cell specific/preferential aptamers. Following treatment, the medium is filtered in a glass wool filter, and sperm in the filtrate is used to perform *in vitro* fertilization.

[0049] In another example, the aptamers against X or Y sperm cell specific surface proteins may bind to and inactivate X or Y sperm cells respectively, and may prevent

21

them from fertilizing an ovum. The sperm cells not bound by the aptamers may remain viable and active for fertilizing ova. Thus, the invention provides a method to produce a semen sample enriched in active X or Y sperm cells and thus capable of increasing the probability that offspring will be of a desired sex or have a gene for a sex-chromosome linked trait.

[0050] In another example, a native sperm preparation may be exposed to a first aptamer that binds, for example, Y specific molecules. The exposed sperm may be suspended together with a conjugate of a second aptamer that binds exclusively to the first aptamer and an immunoabsorbent substrate in a protein-free diluent to form a conjugate/sperm preparation whereby the Y sperm are bound to the substrate. The Y sperm may then be recovered from the substrate by specific binding of the substrate.

[0051] The methods described herein provide the means to separate sperm on factors of quality and desirability, including sperm cell motility, functionality, stimulation, and preservation, which can affect fertility rates, insemination rates, fertilization rates, offspring health, and offspring desirability for various species of mammals, including, but not limited to, humans, horse, cattle, swine, cats, dogs, buffalo, oxen, and elk.

[0052] The methods for separating sperm on the basis of desired characteristics described herein minimize damage to the sperm by mechanical handling so that the sperm have improved viability. The methods are non-invasive, do not require chemical binding to cellular internal structures, involve minimal manipulation, and are inexpensive. There are minimal requirements for equipment or instrumentation and they are readily carried out by a person skilled in the art.

[0053] The aptamers prepared by the present method and methods of the present invention may also be used to evaluate other characteristics of the sperm. For example, they may be used to determine sperm quality, determine male fertility, identify healthy sperm, or identify abnormal or damaged sperm.

22

[0054] The separated sperm cells of the invention are preferably used for artificial insemination of a mammal. Preferably, the mammal is a bovine mammal. The method for artificial insemination comprises administering the sperm to the mammal using techniques known to those skilled in the art.

[0055] The invention further comprises a kit for artificial insemination of a mammal. The kit contains at least the separated sperm cell population of the invention and optionally other components or devices to administer the sperm cell population to the mammal. Preferably, the kit contains the individual sperm cell sample in a tube for insertion into the vagina of the female animal. Such sample tube is known in the art as a "straw".

[0056] Alternatively, the separated sperm of the invention maybe used for *in vitro* fertilization of a mammal. Preferably, the mammal is a human being.

EXAMPLES

SPERM APTAMERS SELECTION METHOD

[0057] A preferred method of selecting specific aptamers according to the present invention employs a method that utilizes several rounds of incubation of unsorted, sorted X and/or sorted Y sperm cells with a DNA library with a final step of collecting the solution with DNA binders and use it as a template for PCR and for strand separation on streptavidin beads. Applicants have determined that more than 6 rounds of sperm aptamer selection according to the present invention is optimal. Preferably 7 rounds, more preferably 8 rounds and even more preferably 9 rounds of selection are performed as outlined below. However, more than 9 rounds of selection can be performed if necessary to obtain aptamers that bind to the specific target molecule. It should be understood that the protocol described below can vary in temperature, volume, and other parameters that do not effect the outcome of the protocol but that will result in the production of specific aptamers that bind to target molecules. Such variations are known to persons skilled in the art.

Rounds 1 – 3 of Aptamer Selection

Preparation of cells:

[0058] Thaw the sperm aliquot by placing the straw in 37 °C water for 1 min, and then keep the cells at room temperature (20-25 °C)(RT).

1. Take 1 straw of unsorted sperm cells (about 0.5 ml and 10^7 cells).
2. Add 1 ml of the PVA (polyvinyl alcohol) containing semen buffer.
3. Spin the sperm cells for 12 min at $300\times g$ at 17 °C in a 1.5 ml vial.
4. Remove the buffer and re-suspend cells in 1ml of fresh PVA-semen buffer.
5. Spin the sperm cells for 12 min at $300\times g$ at 17 °C in a 1.5 ml vials.
6. Resuspend the sperm cells in 300 μ L of the fresh PVA-semen buffer and count the cells using chemocytometer. Dilute the cells to $\sim 2\times 10^6$ cells/ml (40 000 cells per 20 μ L) by adding 600 μ L of buffer.
7. Anneal 50 μ M of naive DNA library (custom ordered from Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA) with the following sequence: 5'-**CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG (SEQ ID NO: 1) -(40N)- GGC TTC TGG ACT ACC TAT GC (SEQ ID NO: 2)**-3' dissolved in PBS (phosphate buffered saline buffer) with 2.5 mM $MgCl_2$ by heating to 94°C for ~ 3 min, then cooling to RT.
8. Add 2 μ L of 1 mM F-primer (forward primer custom ordered from IDT with the following sequence 5'-**CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG** -3') (SEQ ID NO: 1) into the 40 μ L aliquots of cells, to a final concentration of 50 μ M. Fprimer is a first 20 nucleotides of the library. It is used in the selection as a background DNA. This sequence was chosen to decrease the likelihood that at least one of the constant regions of the library will not participate in the binding, and if removed will produce a shorter aptamer sequence but will not change the binding properties.
9. Add 4 μ L of 100 μ M annealed library into the 20 μ L aliquot containing sperm cells with 50 μ M F-primer.

74

10. Incubate for 1 hour at room temperature.
11. Add 200 μ L of fresh PVA-semen buffer and spin for 12 min at 300 $\times$ g at 17 $^{\circ}$ C.
12. Remove the supernatant and re-dissolve the pellet in additional 200 μ L of the PVA-semen buffer.
13. Spin for 12 min at 300 $\times$ g at 17 $^{\circ}$ C.
14. Remove the supernatant and re-dissolve the pellet in additional 200 μ L of the PVA-semen buffer.
15. Spin for 12 min at 300 $\times$ g at 17 $^{\circ}$ C.
16. Remove the supernatant and add 20 μ L of the 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 and incubate cells at 95 $^{\circ}$ C for 5 min.
17. Spin down the cellular debris for 20 min at 20 000 rpm.
18. Collect the supernatant and use it as template for PCR using F primer and biotinylated R-primer (reverse primer custom ordered from IDT with the following sequence: 5'-biotin-GGC TTC TGG ACT ACC TAT GC -3') (SEQ ID NO: 2) and perform strand separation on streptavidin magnetic beads.

[0059] Completion of steps 1 – 18 above constitutes the completion of a single round. The supernatant from 18 is considered to be the Round 1 (R1) aptamer pool and is used directly or is amplified using known PCR techniques. For Round 2 (R2), the R1 aptamer pool is used in place of the naive DNA library in step 7 on a new sample of unsorted cells that are prepared according to steps 1-6. The supernatant or Round 2 (R2) aptamer pool from step 18 of the completion of Round 2 is then utilized directly or amplified using known PCR techniques and added in place of the DNA library in step 7 on a new sample of unsorted cells in Round 3 (R3). The supernatant from step 18 of Round 3 or the Round 3 (R3) aptamer pool is then used in step 7 of Round 4 described below.

25

Rounds 4-11 (Positive and negative selections with sorted cells)Preparation of cells:

[0060] Thaw the sperm aliquots (sorted X or sorted Y containing cells) by placing the straw in 37 °C water for 1 min, and then keep the cells at room temperature (20-25 °C).

1. Take 1 straw of sorted X and 1 straw of sorted Y cells,
2. To each tube, then add 200 µl of fresh PVA semen buffer, and spin for 12 min at 300×g at 17 °C, remove the supernatant leaving about 10 µl add 200µl of fresh PVA-semen buffer and transfer all into the 200 µl PCR vial.
3. Spin the cells for 12 min at 300×g at 17 °C in a 0.2 ml PCR vials (smaller vials improves cell recovery) and remove the buffer leaving about 20 µl.
4. To each tube, add 60 µl of fresh PVA Semen buffer and split in 2 tubes by 30 µl.
5. Count the cells using chemocytometer. It should be around 2×10^6 cells/ml (4×10^4 cells per 20 µl).
6. About 1-2 min before addition of the R3 Aptamer pool (see step 18 of Round 3 above) to the cell suspension, add the F- primer to the final concentration of 50 µM (add 1 µl of 1mM to 20 µL of cells).
7. For negative selection make the following mixtures:
 - A. Y cells with 50 µM of F4 and 5 nM of X Apt pool from previous selection round (or R3 aptamer pool only if it is forth selection round).
 - B. X cells with 50 µM of F4 and 5 nM of Y Apt pool from previous selection round (or R3 aptamer pool only if it is forth selection round).Incubate the mixtures at room temperature for 1 hour and spin the cells down (300×g, 17°C 12 min). Take the supernatant and use it in the positive selection. To each one of X and Y cells aliquots, add F-primer for a final concentration of 50 µM and equal amount of the supernatant from previous step.

- C. To X cells, add supernatant from fraction 1 to get 2.5 nM X aptamer pool and 50 μ M F4.
- D. To Y cells, add supernatant from fraction 2 to get 2.5nM Y aptamer pool and 50 μ M F4.
8. Incubate the mixtures at room temperature for 1 hour.
 9. Add 200 μ L of fresh PVA-semen buffer and spin for 12 min at 300 $\times$ g at 17 $^{\circ}$ C.
 10. Remove the supernatant and re-dissolve the pellet in additional 200 μ L of the PVA-semen buffer.
 11. Spin for 12 min at 300 $\times$ g at 17 $^{\circ}$ C.
 12. Remove the supernatant and re-dissolve the pellet in additional 200 μ L of the PVA-semen buffer.
 13. Spin for 12 min at 300 $\times$ g at 17 $^{\circ}$ C.
 14. Remove the supernatant and add 20 μ L of the buffer and incubate cells at 95 $^{\circ}$ C for 5 min.
 15. Spin down the cellular debris for 20 min at 20 000 rpm.
 16. Collect the supernatant or aptamer pool and use it as template for PCR and strand separation on streptavidin magnetic beads.

[0061] A round of the aptamer selection of Rounds 4-9 and higher rounds include steps 1-16 directly above. The Round 4 aptamer pool is then added to step 7 of the next round, Round 5, then the Round 5 aptamer pool is then added to step 7 of the next round, Round 6, then the Round 6 aptamer pool is then added to step 7 of the next round, Round 7, then the Round 7 aptamer pool is then added to step 7 of the next round, Round 8, then the Round 8 aptamer pool is then added to step 7 of the next round, Round 9, then the Round 9 aptamer pool is then added to step 7 of the next round, and any additional rounds can continue to be repeated accordingly.

[0062] The goal of these rounds of aptamer selection is to obtain a pool of aptamers that bind specifically to Y or X sperm cells. Therefore, at least Round 7 of the selection method should be run to obtain aptamers that specifically bind to the target

27

molecule, more preferably at least Round 8 should be run and most preferably at least Round 9 or higher should be run to obtain a pool of aptamers that are specific for Y containing and X containing sperm.

[0063] Applicants submit that the above method can be utilized to prepare target specific aptamers of any type as long as the pool of cells that contain the target molecule that identifies the cell (unsorted or sorted) is substituted in the rounds of aptamer selection for the Y and X sperm cells both unsorted and sorted.

CELL CYTOMETRY ANALYSIS OF APTAMERS PRODUCED IN APTAMER SELECTION METHOD

[0064] The following method was performed to provide labeled pools of DNA and to provide a sufficient amount of DNA for analysis that could additionally save time and costs in the preparation. The known technique, asymmetric PCR, resulted in the production of one of the DNA strands. In order to determine if a pool of aptamers were good binders, labeled aptamers resulting from the asymmetric PCR technique were mixed with sperm cells and subjected to flow cell cytometry analysis. Naïve DNA library was used as a control.

[0065] Prepare the following mixture containing : 1μM Alexa 647 (obtained from IDT as a custom primer) labelled forward primer (5'-Alexa 647-CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG -3') (SEQ ID NO:1), 50 nM reverse primer (5'-GGC TTC TGG ACT ACC TAT GC -3') (SEQ ID NO:2) 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.6), 2.5 mM MgCl₂, 200 μM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), and 0.05 unit/μL *Taq* DNA polymerase.

[0066] There were 20 PCR cycles performed which includes a PCR cycle consisting of melting at 94°C for 10 seconds, annealing at 56 °C for 10 seconds, and extension at 72°C for 10 seconds. The first cycle has an extended melting step of 30 seconds. As a template, the purified single stranded aptamers pools after each selection round are used. After PCR is completed, the products are purified using the 30kDA cut off DNA

28

purification column (Microcon ultracel YM-30, from Millipore Bedford MA, USA.) using standard procedure described in the manual and known to persons skilled in the art.

[0067] Preparation of cells: Thaw the sperm aliquot by placing the straw in 37°C water for 1 min, and then keep the cells at room temperature (20-25°C).

[0068] Take 1 or more straws of unsorted cells (about 0.5ml and 10^7 cells)

1. Add 1 ml of the PVA semen buffer.
2. Spin the cells for 12 min at 300×g at 17°C in a 1.5 ml vial.
3. Remove the buffer and re-suspend cells in 1ml of fresh PVA buffer.
4. Spin the cells for 12 min at 300×g at 17 °C in a 1.5 ml vial.
5. Re-suspend cells in 300 µl of the fresh PVA containing semen buffer and count the cells using haemocytometer.
6. Dilute cells to $\sim 2 \times 10^6$ cells/ml (20 000-40 000 cells per 20 µL); and
7. 200 µl of cells + 10 µl of 1mM F4 primer then aliquot by 20 µl each.

[0069] In parallel:

1. Take 1 or more straws of sorted X and 1 or more straws of sorted Y cells.
2. Spin for 12 min at 300×g at 17°C, remove the supernatant leaving about 10 µL add 200µl of fresh PVA Semen buffer and transfer all into the 200 µl PCR vial.
3. Spin the cells for 12 min at 300×g at 17°C in a 0.2 ml PCR vials (smaller vials improves cell recovery) and remove the buffer leaving about 20µl.
4. To each tube, then add 200 µl of fresh PVA Semen buffer.
5. Count the cells using haemocytometer it should be around 2×10^6 cells/ml (4×10^4 cells per 20µL).

29

6. Mix X cell mix with 1 mM F primer for a final concentration of 50 μ M and make as many 20 μ L aliquots as required for analysis.
7. Mix Y cell mix with 1 mM F primer for a final concentration of 50 μ M and make as many 20 μ L aliquots as required for analysis.
8. Mix unsorted cells with 1 mM F primer for a final concentration of 50 μ M and make as many 20 μ L aliquots as required for analysis.
9. Anneal the purified DNA libraries, and pools dissolved in PBS with 2.5mM $MgCl_2$. (heat to 94°C for ~3 min, then cool down at RT).
10. Add appropriate amounts of each aptamer pool from the rounds of aptamer selection described above that is to be tested into the 20 μ L aliquot containing sperm cells with 50 μ M F4 to a final concentration of ~10 nM: Make the following mixtures: unsorted, sorted X and sorted Y cells each with Naive DNA library and the pools from each selection round.
11. Incubate for 1 hour at room temperature.
12. Add 200 μ L of fresh PVA-semen buffer and spin for 12 min at 300 $\times$ g at 17°C.
13. Remove supernatant and add 200 μ L of fresh PVA-buffer and transfer everything to the cell cytometry tube, and
14. Add the PI (propidium iodide, a nucleic acid stain and a dead cell marker, Sigma Aldrich) about 2-3 min before the analysis and additional 200 μ L of the PVA-semen buffer.

[0070] Figure 1 provides the analysis of the aptamers obtained by the present method in which 9 rounds of aptamer selection and analysis using flow cytometry was performed. Each population of live spermatozoa was represented by 8,000 to 9,000 cells. Live cells population were differentiated from dead cells by Propidium Iodide, a dead cell stain.

[0071] Comparing the binding of X sorted cells to the naïve library and to the X aptamer pool (Figure 1, traces C and D, respectively), the results show that the X

30

aptamer pool has about 10 times greater affinity to the X cells than the naïve library. This data shows that sperm cell specific aptamers were obtained from the library during the selection process. Then, the comparison of the binding affinities of X aptamer pool to X and Y sorted cells (Figure 1, traces D and B, respectively) indicates that aptamer affinity to X cells is about 20 times greater than to Y cells. All the above data, together with the fact that the affinity of Y cells to the naïve DNA library, and to the X aptamer pool (Figure 1, traces A and B, respectively) is relatively similar proves that the present method produces X cell specific aptamers, which can specifically bind to the X cells and has no, or very insignificant affinity to Y cells.

[0072] With regard to the binding of Y cells to the naïve DNA library and to the Y aptamer pool, data (not shown) shows that Y cells bind better to the Y aptamer pool than they do to the naïve DNA library which is indicative of Y specific aptamers.

[0073] After that six rounds of selection, the binding experiment was performed and the X pool of aptamers showed great binding affinity to the X cells and weak to no binding affinity to the Y cells (Figure 2A). The Y pool of aptamers showed binding affinity to both the X and Y cells (Figure 2B). The binding was observed using fluorescently labeled DNA and fluorescence confocal microscopy. The signal was measured using non-motile cells.

[0074] Generally, the present method provides aptamers that bind to target molecules that may or may not be on the surface of a cell but should be accessible from the surface of a cell, such as preferably a X or Y sperm cells. The cell cytometry analysis described herein provides a method to determine whether an aptamer pool obtained in the last step of a single round aptamer selection round as described herein contains one or more aptamers that bind to a target molecule. One should review the data and compare the binding of the aptamer pool with a sample containing the target molecule. This binding data should be compared with any binding of the same aptamer pool to the naïve DNA library, preferably the library from which the aptamer pools were first obtained as a negative control. Additionally, the aptamer pool binding also should be

31

compared to a second or third sample that does not contain the target molecule. Results that show higher binding of the aptamer pool to the target molecule as compared to the binding to the naïve DNA library is considered as a positive preferential binding. Additionally, further rounds of selection as disclosed herein may increase the binding affinity of the aptamer pool. Additionally, if one wishes to separate two cell populations based on specific binding to one cell and not the other, such as with the separation of X and Y sperm cells, then in addition to comparing the binding of the aptamer pool to the naïve DNA library, the aptamer pool binding also should be analyzed for its binding to the preferred target molecule as well as a sample containing the "non-target" molecule from which one wishes to separate the target molecule. In this latter instance, all of these comparisons should be analyzed to select aptamer pools that bind to a specific target molecules and do not bind or binds to a lesser degree or less preferentially to the cell or molecule from which one wants to separate the target molecule. Thus, using aptamers to separate different sperm cell populations requires analysis and comparison to different controls and negative controls.

[0075] Table 1 provides aptamers obtained from the aptamer pool after Round 9 according to the procedure provided above that bound preferentially to the X sperm cells and which did not bind or which bound less preferentially to the Y sperm cells than to the X sperm cells. The aptamers in Table 1 (SEQ ID NOS: 3-35) show portions of the nucleotides on the 5' end and the 3' end of each sequence that is underlined. These portions represent the constant regions of the aptamers that correspond to the forward primer **CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG** (SEQ ID NO: 1) at the 5' end and the reverse primer, **GGC TTC TGG ACT ACC TAT GC** (SEQ ID NO: 2) at the 3' end used to generate the aptamers from the naïve library, NP40. Each of these constant regions are 20 nucleotides in length. The aptamers of the present invention are intended to encompass the nucleotide length sequence of each of SEQ ID NOS: 3-35 or a portion thereof. In a further embodiment, an aptamer of the present invention comprises nucleotides 21-60 of SEQ ID NOS: 3-10 and 12-35 or portions thereof or nucleotides 21-43 of SEQ ID NO: 11 or portions thereof. For an aptamer (SEQ ID

NOS: 3-35) or a portion of the recited sequence to be considered to be an aptamer within the meaning of the present invention, it must bind preferentially to a target molecule on an X or Y sperm cell at a higher affinity than any contaminating or control cells.

[0076] The DNA sequences in Table 1 represent selected sequences that were located in the Round 9 aptamer pool. Several of the sequences were present in the aptamer pool in multiple copies.

Table 1

SEQ ID NO: 3
CTCCTCTGACTGTAACCACGCACCGAATACAGACTGTAAAGACAGAAAGTTCATAAACGTGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 4
CTCCTCTGACTGTAACCACGTACGCTATTATTATTCAATAACGATAAGACTTATAATATAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 5
CTCCTCTGACTGTAACCACGTATAATCATCGGGTAAGTTGAGGCATTATCTACGCCATAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 6
CTCCTCTGACTGTAACCACGATACCAATACGTAAATTCTATAAGGCATACATATTATACAAGCATAGGTA
GTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 7
CTCCTCTGACTGTAACCACGTCTGGAACATGATGCAGGTGTCTAACAGTATGAATACTTGGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 8
CTCCTCTGACTGTAACCACGCTGTCGACTACAGATCACTACTTTTCGCTAAGGTACCTCAAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 9
CTCCTCTGACTGTAACCACGTATAACGTTTTTCATCTATTTGTTTACTTAATACCTAATAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 10
CTCCTCTGACTGTAACCACGATTGTATTAGTTAACGATACTTATTATTTGTAAGTTATTAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

33

WO 2008/028081

PCT/US2007/077300

SEQ ID NO: 11

CTCCTCTGACTGTAACCACGAATAACATTACATATAGTTACTTGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 12

CTCCTCTGACTGTAACCACGGTAAACATGATAATAACTTCTCCTTTTGTAATGGATTGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 13

CTCCTCTGACTGTAACCACGGGTACATATATCCCTATTAATTGACACATATATTTACTTAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 14

CTCCTCTGACTGTAACCACGCATCATTTTCGCTAATAGATAAAGTGTCGTCGTCAGAGCAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 15

CTCCTCTGACTGTAACCACGATACATTTACGTAAATTCTATTAACATTTATATTCTACATGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 16

CTCCTCTGACTGTAACCACGTAATATTAACCTTTAAACTCCAATACTGTTATTTATCAAGTGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 17

CTCCTCTGACTGTAACCACGGTATATCGACTTATTACAATGATAAGTATTATTAACTTAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 18

CTCCTCTGACTGTAACCACGAAACATTACATGGAACCTTGATCGTTTAGGATAATAAATGCGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 19

CTCCTCTGACTGTAACCACGTGTACCACTTTCTGTTACGCTAATGGCACACTACACTTAAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 20

CTCCTCTGACTGTAACCACGTAACCTTGAATAATACTTCTTGTAATTTTGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 21

CTCCTCTGACTGTAACCACGTAATATATGAGTTATTTATGAGTTCATTGAATTCTACTTGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 22

CTCCTCTGACTGTAACCACGGAGTCAGCCTGATCTACCTTCAAAGGCCACTAGGCCTTGAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 23

CTCCTCTGACTGTAACCACGTATACTTACTTTACTAAACTACTACTAAGTAAGTAACAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

34

SEQ ID NO: 24

CTCCTCTGACTGTAACCACGTCACCTTACATTTAAATCAATGTATATCAATATTTTAGTCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 25

CTCCTCTGACTGTAACCACGTCAGGATAATGATCATAAGATATCTTTATGTATATACTATGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 26

CTCCTCTGACTGTAACCACGCCAGTTCGTCATCAGATTCCATCTTTAGCTACTTACAACCTGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 27

CTCCTCTGACTGTAACCACGCAAAAGTCACTGGCCGTTTCGAGTTATATGAGTAGGGAGAGGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 28

CTCCTCTGACTGTAACCACGCCAGACCGGATCCCTGATGTATTTATTTTCGGAAGGTTGAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 29

CTCCTCTGACTGTAACCACGTAATGAGTGACGAAAGTGTCAGATGGAGCCTTCTACCTGTGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 30

CTCCTCTGACTGTAACCACGCGATTAAACCGGCAGTTATCTCTTAGCAAGCCTGATCCTGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 31

CTCCTCTGACTGTAACCACGGGTTCAATGTAAGGGTTGGTGTGGTTGGACTAGCGCTCAGTCATAGGTA
GTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 32

CTCCTCTGACTGTAACCACGGCATATGTGAGCATCGAATAGCTGGCGACGAACCAGATTGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 33

CTCCTCTGACTGTAACCACGACGACAGTCATCCCTGACTCGGATCTTACATGTCGTTACAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 34

CTCCTCTGACTGTAACCACGTTAAATCTTATAGGATTCTAGTGTACAAATATATAACTTAGCATAGGTAG
TCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 35

CTCCTCTGACTGTAACCACGCAAAAGTCACTGGCCGTTTCGAGTTATATGAGTAGGGAGAGGCATAGGTAG
TCCAGAAGAT

[0077] Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. The use of the words

35

“a” or “an” herein to describe any aspect of the present invention is to be interpreted as indicating one or more.

[0078] Although this invention has been described in relation to certain preferred embodiments thereof, and many details have been set forth for purposes of illustration, it will be apparent to those skilled in the art that the invention is susceptible to additional embodiments and that certain of the details described herein may be varied considerably without departing from the basic principles of the invention.

What is claimed is:

1. An isolated non-naturally occurring nucleic acid sequence that binds to a target molecule on a mammalian sperm cell comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
 - (a) a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 3-35 or a target molecule binding portion thereof;
 - (b) a nucleotide sequence which is substantially homologous to and has substantially the same ability to bind said target molecule on said sperm cell as the nucleotide sequence of (a) or a target molecule binding portion thereof; and
 - (c) a nucleotide sequence having substantially the same structure and having substantially the same ability to bind said target molecule on said sperm cell as the nucleotide sequence of (a) or (b) or a target molecule binding portion thereof.
2. The isolated non-naturally occurring nucleic acid sequence of claim 1, wherein at least a portion of nucleotides 1-20 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-35 or a target molecule binding portion thereof.
3. The isolated non-naturally occurring nucleic acid sequence of claim 1, wherein at least a portion of nucleotides 61-80 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-10 and 12-35 or nucleotides 44-63 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof.
4. The isolated non-naturally occurring nucleic acid sequence of claim 1, wherein at least a portion of nucleotides 1-20 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-35 and/or wherein at least a portion of nucleotides 61-80 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-10 or 12-35 or nucleotides 44-63 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof.
5. The isolated non-naturally occurring nucleic acid sequence of claim 1, wherein said DNA sequences comprises nucleotides 21-60 of SEQ ID NOS: 3-10 or 12-35 or nucleotides 21-43 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof.

37

6. A composition comprising at least one of the nucleic acid sequences selected from the group consisting of:
- (a) a nucleic acid sequence of claim 1;
 - (b) a nucleic acid sequence of (a), wherein at least a portion of nucleotides 1-20 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-35 or a target molecule binding portion thereof;
 - (c) a nucleic acid sequence of (a), wherein at least a portion of nucleotides 61-80 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-10 and 12-35 or nucleotides 44-63 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof;
 - (d) a nucleic acid sequence of (a), wherein at least a portion of nucleotides 1-20 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-35 and/or wherein at least a portion of nucleotides 61-80 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-10 or 12-35 or nucleotides 44-63 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof; and
 - (e) a nucleic acid sequence of (a), wherein said DNA sequences comprises nucleotides 21-60 of SEQ ID NOS: 3-10 or 12-35 or nucleotides 21-43 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof.
7. A method of separating a mixture of mammalian sperm cells containing at least one target molecule comprising:
- contacting the mammalian sperm cells with the composition of claim 6 for a sufficient period of time to allow binding of the nucleic acid sequence to bind to the sperm cells; and
 - separating the sperm cells into two or more populations of sperm cells based on the ability of at least one nucleic acid sequence to bind to a target molecule on a sperm cell.
8. The method of claim 7, further comprising separating said two or more populations of sperm cells bound to the nucleic acid sequence from the nucleic acid sequence and recovering the separated sperm cells.
9. The method of claim 8, wherein nucleic acid sequence binds preferentially to the X sperm cells and a population of predominantly X sperm cells are recovered.

38

10. The method of claim 8, wherein nucleic acid sequence binds preferentially to the y sperm cells and a population of predominantly Y sperm cells are recovered.
11. The method of claim 7, wherein the mammalian sperm cells are cattle sperm cells or human sperm cells.
12. The method of claim 7, wherein at least one of the sperm cell populations comprises Y sperm cells or X sperm cells.
13. The method of claim 8, wherein at least one of the sperm cell populations comprises sperm cells unbound to the nucleic acid sequence.
14. The method of claim 8, wherein at least one of the sperm cell populations comprises sperm cells bound to the nucleic acid sequence.
15. The method of claim 7, wherein the composition comprises two or more different nucleic acid sequence.
16. The method of claim 7, wherein the nucleic acid sequence is bound to a non-magnetic bead or a magnetic bed.
17. A method for producing at least one nucleic acid sequence that binds to a target molecule on the surface of a mammalian sperm cell comprising the steps of:
 - (a) contacting a collection of different nucleic acid molecules with said target molecule under conditions favorable for binding between at least one of said nucleic acid molecules and said target molecule, to form at least one complex comprising said at least one nucleic acid molecule bound to a target molecule, wherein each of said nucleic acid molecules comprises at least one segment of randomized nucleotide sequences;
 - (b) separating said complexes from the unbound nucleic acid molecules and unbound target molecules; and
 - (c) recovering the bound nucleic acid molecules from the separated complex, wherein said bound nucleic acid molecules comprise at least one nucleic acid sequence that binds to said target molecule;

39

wherein at least one nucleic acid sequence is selected from the group consisting of:

- (a) a nucleic acid sequence of claim 1;
- (b) a nucleic acid sequence of (a), wherein at least a portion of nucleotides 1-20 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-35 or a target molecule binding portion thereof;
- (c) a nucleic acid sequence of (a), wherein at least a portion of nucleotides 61-80 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-10 and 12-35 or nucleotides 44-63 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof;
- (d) a nucleic acid sequence of (a), wherein at least a portion of nucleotides 1-20 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-35 and/or wherein at least a portion of nucleotides 61-80 are deleted from said SEQ ID NOS: 3-10 or 12-35 or nucleotides 44-63 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof; and
- (e) a nucleic acid sequence of (a), wherein said DNA sequences comprises nucleotides 21-60 of SEQ ID NOS: 3-10 or 12-35 or nucleotides 21-43 of SEQ ID NO: 11 or a target molecule binding portion thereof.

18. The method of claim 17, further comprising the step of amplifying the recovered nucleic acid molecule to create additional nucleic acid molecules.

19. The method of claim 17, wherein said contacting step comprises incubating said molecules to form an equilibrium mixture and wherein said separating step comprises capillary electrophoresis.

20. The method of claim 17, wherein said target molecule is selected from the group consisting of a protein, a peptide, an enzyme, a lipid, a glycolipid, a phospholipid, a glycoprotein, a carbohydrate, a small molecule or a cell surface molecule.

21. The method of claim 20, wherein said target molecule is a target molecule contained on a sperm cell.

22. The method of claim 21, wherein said target molecule distinguishes at least one X sperm cell from at least one Y sperm cell.

23. The method of claim 21, wherein said sperm cells are cattle sperm cells or human sperm cells.

40

24. The method of claim 17, wherein said recovered nucleic acid sequences of step (c) are subsequently used as the collection of different nucleic acid molecules in step (a).
25. The method of claim 17, wherein steps (a), (b) and (c) are repeated 1 or more, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, or 8 or more times to produce a nucleic acid sequence preferential for Y sperm cells or X sperm cells.
26. The method of claim 17, further comprising incubating said collection of different nucleic acid molecules and said target molecule with a primer that is substantially complementary to template nucleic acid sequence.
27. The method of claim 26, wherein said template nucleic acid sequence is a sequence that corresponds to a segment of said nucleic acid sequence that is unvaried within a plurality of aptamers.
28. The method of claim 27, wherein said nucleic acid sequence is from a DNA library and said template nucleic acid sequence is a vector sequence.
29. The method of claim 17, wherein step (a) further comprises a negative selection step followed by a positive selection step.
30. The method of claim 17, wherein said recovered nucleic acid sequence is purified.
31. The method of claim 17, wherein a plurality of the recovered nucleic acid sequence are quantified using flow cytometry.
32. The method of claim 22, wherein said nucleic acid sequence permits separation of Y sperm cells from X sperm cells, wherein said method produces a first group of nucleic acid sequence that bind to Y sperm cells in said first sample and a second group of nucleic acid sequence that bind to X sperm cells in said second sample; and said method further comprises:
- (d) comparing said first and second groups of nucleic acid sequence to identify by process elimination at least one nucleic acid sequence that binds only to either the Y sperm cells or the X sperm cells.

41

33. The method of claim 32, wherein said first and second samples of mammalian sperm cells are produced by flow cytometry and cell sorting.

34. The method of claim 32, wherein the nucleic acid sequence are produced by the process wherein the contacting step (a) further comprises:

(a1) contacting a first collection of different nucleic acid molecules with a target molecule contained in a first sample of Y sperm cells under conditions favorable for binding between said nucleic acid molecules and said Y sperm cells to form at least one complex comprising at least one nucleic acid molecule bound to at least one Y sperm cell, wherein each of said nucleic acid molecules comprises at least one segment of randomized nucleotide sequences; and

(a2) contacting a second collection of different nucleic acid molecules with a target molecule contained in a second sample of X sperm cells under conditions favorable for binding between said nucleic acid molecules and said X sperm cells to form at least one complex comprising at least one nucleic acid molecules bound to at least one X sperm cell, wherein each of said nucleic acid molecules comprises at least one segment of randomized nucleotide sequences; and

wherein recovery step (c) thereby produces at least one nucleic acid sequence that binds to Y sperm cells and/or at least one nucleic acid sequence that binds to X sperm cells.

35. The method of claim 34, wherein nucleic acid sequences that bind to Y sperm are recovered.

36. The method of claim 34, wherein nucleic acid sequences that bind to X sperm are recovered.

37. The method of claim 32, wherein prior to step (a), at least 1 round of contact of said nucleic acid molecules with an unsorted cell population comprising both X sperm cells and Y sperm cells occurs.

38. The method of claim 32, wherein said separating step (b) further comprises the step of separating said sperm cells bound to the nucleic acid sequence from the nucleic acid sequence and said recovering step (c) further comprises recovering the separated sperm cells.

39. The method of claim 32, wherein the mammalian sperm cells are cattle sperm cells or human sperm cells.

40. The method of claim 17, wherein the nucleic acid sequence is bound to a non-magnetic bead or a magnetic bead.

41. A method for producing a nucleic acid sequence that permits separation of Y sperm cells from X sperm cells comprising the steps of:

- (a) obtaining a first sample of Y sperm cells and a second sample of X sperm cells;
- (b) producing a first group of nucleic acid sequences that bind to Y sperm cells in said first sample and a second group of nucleic acid sequences that bind to X sperm cells in said second sample; and
- (c) comparing said first and second groups of nucleic acid sequences to identify by process elimination at least one nucleic acid sequences that binds only to either the Y sperm cells or the X sperm cells.

42. A method for producing a nucleic acid sequence that permits separation of X sperm cells from Y sperm cells comprising the steps of:

- (a) contacting a mixed population of X and Y sperm cells with a nucleic acid sequence, that preferentially binds to the X sperm cells to form bound nucleic acid-X sperm cell complexes;
- (b) separating the X sperm cells from the original mixed sperm cell population leaving a Y containing rich sperm cell population; and
- (c) releasing the bound X sperm cells from the nucleic acid sequence-X sperm cell complexes; and

(d) recovering the X sperm cells.

43. The method of claim 42, wherein said nucleic acid comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 3-35 or a target molecule binding portion thereof;

(b) a nucleotide sequence which is substantially homologous to and has substantially the same ability to bind said target molecule on said sperm cell as the nucleotide sequence of (a) or a target molecule binding portion thereof; and

(c) a nucleotide sequence having substantially the same structure and having substantially the same ability to bind said target molecule on said sperm cell as the nucleotide sequence of (a) or (b) or a target molecule binding portion thereof.

44. The method of claim 42, wherein said Y sperm cells are recovered from step (b).

45. The sperm cell population produced by the method of claim 32, or a kit for artificial insemination of a mammal containing said sperm cell population comprising sperm cells bound to said aptamer.

46. The sperm cell population produced by the method of claim 32, or a kit for artificial insemination of a mammal containing said sperm cell population comprising sperm cells unbound to said aptamer.

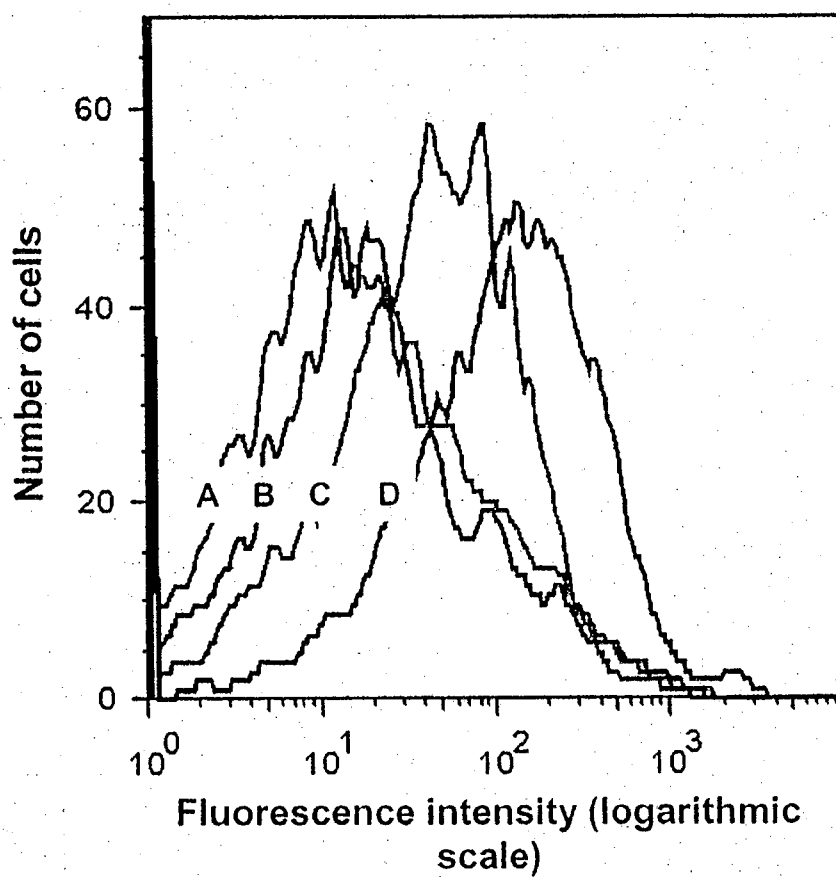
47. The sperm cell population or said kit of claim 45, wherein said sperm cells are cattle sperm cells.

48. The sperm cell population or said kit of claim 45, wherein said sperm cells are human sperm cells.

49. The sperm cell population or said kit of claim 45, comprising X sperm cells or Y sperm cells.

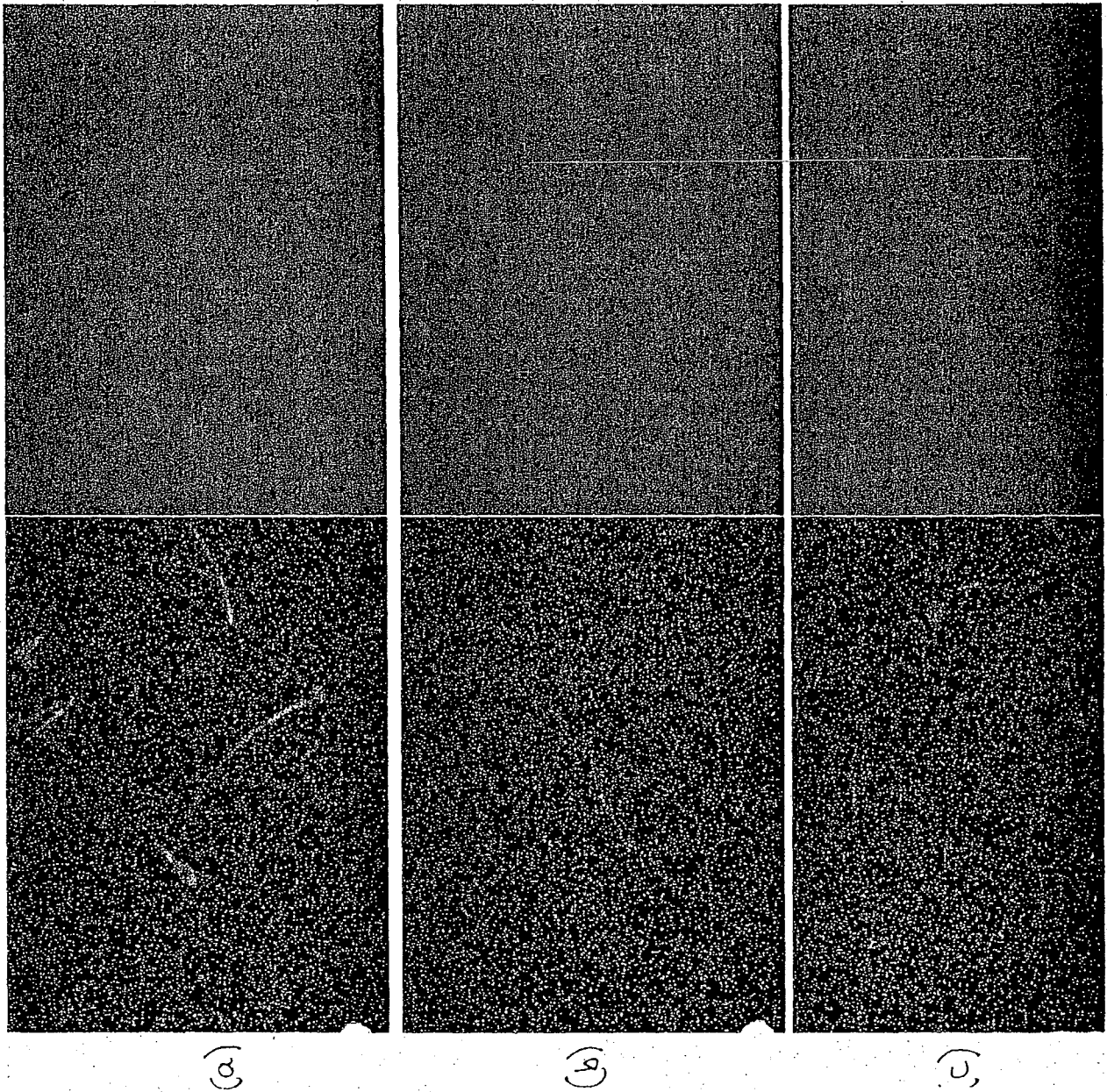
50. A method for artificial insemination of a mammal comprising administering to said mammal the sperm cell population comprising sperm cells bound to said nucleic acid sequence or unbound to said nucleic acid produced by the method of claim 32.

Figure 1



45

Figure 2A. Binding analysis of the enriched X-cells specific aptamer pool. Fluorescence confocal images of sperm cells (*Left*); and Optical images of sperm cells (*Right*). (a) X-specific aptamer pool with the X cells; (b) X-specific aptamer pool with the Y cells; (c) Naïve DNA library with X cells.



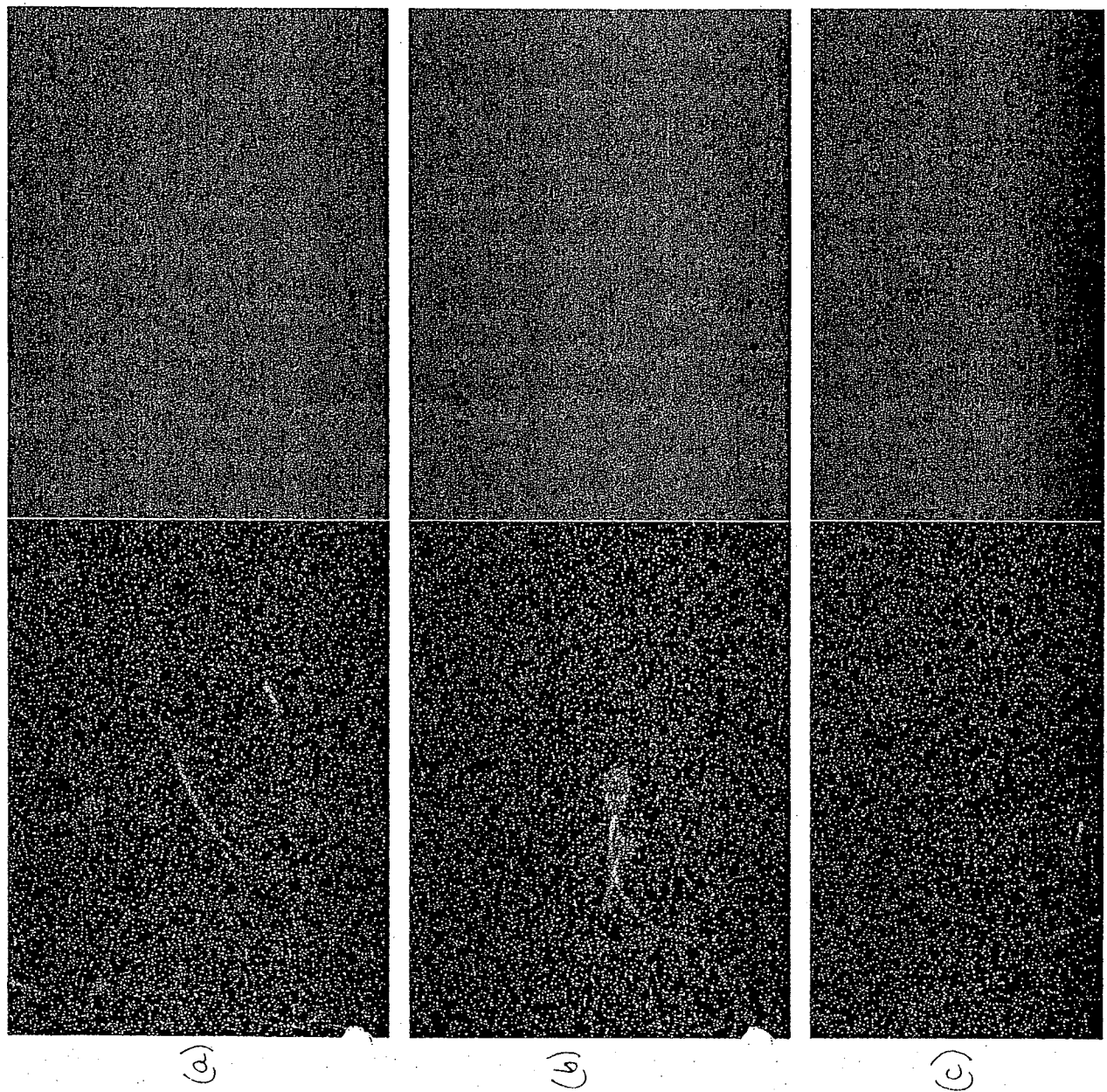


Figure 2B. Binding analysis of the enriched Y-cells specific aptamer pool. Fluorescence confocal images of sperm cells (*Left*); and Optical images of sperm cells (*Right*). (a) Y-specific aptamer pool with the Y cells; (b) Y-specific aptamer pool with the X cells; (c) Native DNA library with Y cells.

47

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)
SEQUENCE LISTING

<110> Biocern, Inc.

<120> SPERM CELL SEPARATION METHODS AND COMPOSITIONS CONTAINING
APTAMERS FOR USE THEREIN

<130> BICE-003/01WO

<150> US 60/824,069

<151> 2006-08-30

<160> 35

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be ALEXA 647 fluorescently labeled

<400> 1

ctcctctgac tgtaaccacg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be biotinylated

<400> 2

ggcttctgga ctacctatgc

20

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)

<210> 3
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 3
ctcctctgac tgtaaccacg caccgaatac agactgtaaa gacagaaagt tcataaacgt 60

gcataggttag tccagaagcc 80

<210> 4
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 4
ctcctctgac tgtaaccacg tacgctatta ttattcaata acgataagac ttataatata 60

gcataggttag tccagaagcc 80

<210> 5
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 5
ctcctctgac tgtaaccacg tataatcatt ggggttaagt gaggcattat ctacgccata 60

gcataggttag tccagaagcc 80

<210> 6
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 6
ctcctctgac tgtaaccacg ataccaatac gtaaattcta taaggcatac atattataca 60

BICE 003 01W0 SeqList_ST25 (2)

agcataggta gtcagaagc c

81

- <210> 7
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 7
ctcctctgac tgaaccacg tctggaacat gatgcaggta tctaacagta tgaatacttg 60

gcataggtag tccagaagcc

80

- <210> 8
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 8
ctcctctgac tgaaccacg ctgtcgacta cagatcacta ctttcgctaa ggtacctcaa 60

gcataggtag tccagaagcc

80

- <210> 9
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 9
ctcctctgac tgaaccacg tataacgttt ttcattctatt tgtttactta atacctaata 60

gcataggtag tccagaagcc

80

- <210> 10
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>

50

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)

<223> Aptamer

<400> 10

ctcctctgac tgytaaccacg attgtattag ttaacgatac ttattatttg taagttatta 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 11

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 11

ctcctctgac tgytaaccacg aataacatta catatagtta ctgcatagg tagtccagaa 60

gcc

63

<210> 12

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 12

ctcctctgac tgytaaccacg gtaaacaatga taataatact tctccttttg taatggattt 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 13

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 13

ctcctctgac tgytaaccacg ggtacatata tccctattaa ttgacacata tattttactta 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 14

<211> 80

51

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 14

ctcctctgac tgaaccacg catcatttcg ctaatagata aagtgttcgt cgtcagagca 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 15

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 15

ctcctctgac tgaaccacg atacatttac gtaaattcta ttaacattta tattctacat 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 16

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 16

ctcctctgac tgaaccacg taatattaac tttaaactcc aatactgtta tttatcaagt 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 17

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 17

ctcctctgac tgaaccacg gtatatcgac ttattacaat gataagtatt attaaactta 60

gcataggtag tccagaagcc

80

52

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)

<210> 18
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 18
ctcctctgac tgytaaccacg aaacattaca tgygaactga tcgttttagga taatnaatgc 60
gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 19
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 19
ctcctctgac tgytaaccacg tgtaccactt tctgttacgc taatggcaca ctacacttaa 60
gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 20
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 20
ctcctctgac tgytaaccacg taacttggaa taatacttct tgytaaatttt gcataggtag 60
tccagaagcc 70

<210> 21
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

53

BICE 003 01WO SeqList ST25 (2)

<400> 21

ctcctctgac tgtaaccacg taaatatatg agttatttat gagttcatty aattctactt 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 22

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 22

ctcctctgac tgtaaccacg gagtcagcct gatctacctt caaaggccac taggccttga 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 23

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 23

ctcctctgac tgtaaccacg tatacttact ttactaaaac tactactaag taagtaaaca 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 24

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 24

ctcctctgac tgtaaccacg tatcacttac atttaaata atgtatatca atattttagt 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 25

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

54

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)

<220>

<223> Aptamer

<400> 25

ctcctctgac tgtaaccacg tcaggataat gatcataaga tatctttatg tatatactat 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 26

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 26

ctcctctgac tgtaaccacg ccagttcgtc atcagattcc atcttttagct acttacaact 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 27

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 27

ctcctctgac tgtaaccacg caaaagtcac tggccgttcg agttatatga gtagggagag 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 28

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 28

ctcctctgac tgtaaccacg ccagaccgga tccctgatgt atttatttc ggaagggtga 60

gcataggtag tccagaagcc

80

SS

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)

<210> 29
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 29
ctcctctgac tgaaccacg taatgagtga cgaaagtgtc agatggagcc ttctacctgt 60
gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 30
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 30
ctcctctgac tgaaccacg cgattaaaac cggcagttat ctcttagcaa gctggtcct 60
gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 31
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 31
ctcctctgac tgaaccacg ggttcaatgt aagggttggg gtggttgagc tagcgctcag 60
tgcataggtg gtccagaagc c 81

<210> 32
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 32
ctcctctgac tgaaccacg gcatatgtga gcatcgaata gctggcgacg aaccagattc 60

56

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)

gcataggtag tccagaagcc 80

- <210> 33
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 33
ctcctctgac tgytaaccacg acgacagtea tccctgactc ggatcttaca tgcggttaca 60

gcataggtag tccagaagcc 80

- <210> 34
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 34
ctcctctgac tgytaaccacg ttaaactctta taggattcta ggtacaaat atataactta 60

gcataggtag tccagaagcc 80

- <210> 35
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 35
ctcctctgac tgytaaccacg caaaagtcac tggccgttcg agttatatga gtagggagag 60

gcataggtag tccagaagat 80

57

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 March 2008 (06.03.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/028081 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 31/70 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2007/077300

(22) International Filing Date: 30 August 2007 (30.08.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/824,069 30 August 2006 (30.08.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BIO-
CERN, INC. [US/US]; 92 Adam Way, Atherton, CA
94027 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): OKSENBERG,
David, A. [US/US]; c/o BIOCERN, INC., 92 Adam Way,
Atherton, CA 94027 (US). KRYLOV, Sergey [CA/CA];
45 Quaker Ridge Road, Concord, Ontario L4K (CA).
MUSHEEV, Michael [CA/CA]; 775 Steeles Ave W., Apt.
1504, North York, Ontario M2R 2S8 (CA).

(74) Agents: HULEATT, Jayme, A. et al.; Cooley Godward
Kronish LLP, 1200 19th Street, N.W., Suite 500, Washing-
ton, DC 20036 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

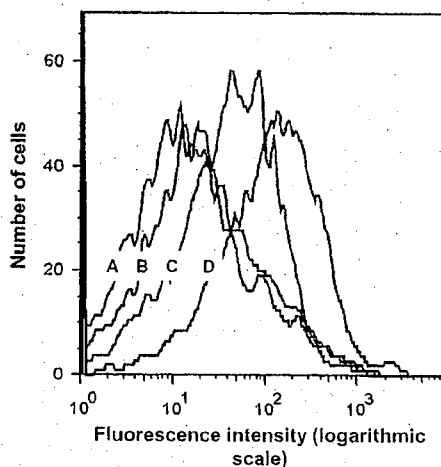
Published:

— with international search report

— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

[Continued on next page]

(54) Title: SPERM CELL SEPARATION METHODS AND COMPOSITIONS CONTAINING APTAMERS OR NUCLEIC ACID
SEQUENCES FOR USE THEREIN



(57) Abstract: The present invention provides an aptamer or pool of aptamers that bind(s) to a target molecule on the surface of a mammalian sperm cell and a method for producing the aptamers. The method comprises contacting a collection of different nucleic acid molecules with the target molecule under conditions favorable for binding between at least one of the nucleic acid molecules and the target molecule, to form at least one complex comprising the nucleic acid molecule bound to the target molecule, wherein each of the nucleic acid molecules comprises at least one segment of randomized nucleotide sequences. The complexes are then separated from the unbound nucleic acid molecules and unbound target molecules, and the bound nucleic acid molecule is recovered from the separated complex. The aptamers are used to separate sperm cells based upon sperm cell qualities, such as whether the cells contain X chromosomes or Y chromosomes.

WO 2008/028081 A3

58

WO 2008/028081 A3



— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:
12 June 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/77300

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8): A61K 31/70(2006.01);C07H 21/02(2006.01);C12Q 1/68(2006.01)

USPC: 514/44;536/23.1;435/6

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 514/44; 536/23.1; 435/6

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

USPAT, US-PGPUB, USPTO SEQUENCE DATABASES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2004/0142384 A1 (COHEN et al) 22 July 2004 (22.07.2004)	41, 42, 44
Y	US 2005/0114915 A1 (COHEN et al) 26 May 2005 (26.05.2005), paragraphs [0041], [0064]	41, 42, 44
Y	US 6,001,988 (PARMA et al) 14 December 1999 (14.12.1999), col 3, ln 15-19; col 7, ln 64-66	41, 42, 44
Y	US 6,126,835 (BARBERA-GUILLEM et al) 3 October 2000 (03.10.2000), paragraph bridging col 3-4	41, 42, 44

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 March 2008 (19.03.2008)

Date of mailing of the international search report

07 APR 2008

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

SAMUEL WOOLWINE

Telephone No. (571) 272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/77300

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-50 with regard to SEQ ID NO:3-6

- Remark on Protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference BICE-00301WO	FOR FURTHER ACTION	See item 4 below
International application No. PCT/US2007/077300	International filing date (day/month/year) 30 August 2007 (30.08.2007)	Priority date (day/month/year) 30 August 2006 (30.08.2006)
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant BIOCERN, INC.		

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

☒ Box No. I	Basis of the report
☐ Box No. II	Priority
☐ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☒ Box No. IV	Lack of unity of invention
☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐ Box No. VI	Certain documents cited
☐ Box No. VII	Certain defects in the international application
☒ Box No. VIII	Certain observations on the international application

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).

	Date of issuance of this report 03 March 2009 (03.03.2009)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Dorothee Mülhausen
Facsimile No. +41 22 338 82 70.	e-mail: pt01.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITYTo:
JAYME A. HULEATT
COOLEY GODWARD KRONISH LLP
1200 19TH STREET, N.W., SUITE 500
WASHINGTON, DC 20036

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Applicant's or agent's file reference BICE-003/01WO 306509		Date of mailing (day/month/year) 07 APR 2008 FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below
International application No. PCT/US07/77300	International filing date (day/month/year) 30 August 2007 (30.08.2007)	Priority date (day/month/year) 30 August 2006 (30.08.2006)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC(8): A61K 31/70(2006.01);C07H 21/02(2006.01);C12Q 1/68(2006.01) USPC: 514/44;536/23.1;435/6		
Applicant BIOCERN, INC.		

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- | | | |
|-------------------------------------|--------------|--|
| ☒ | Box No. I | Basis of the opinion |
| ☐ | Box No. II | Priority |
| ☐ | Box No. III | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| ☒ | Box No. IV | Lack of unity of invention |
| ☒ | Box No. V | Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| ☐ | Box No. VI | Certain documents cited |
| ☐ | Box No. VII | Certain defects in the international application |
| ☒ | Box No. VIII | Certain observations on the international application |

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/ US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Date of completion of this opinion 19 March 2008 (19.03.2008)	Authorized officer SAMUEL WOOLWINE Telephone No. (571) 272-1600
--	--	---

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (April 2007)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US07/77300

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a)).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☒ on paper
- ☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☒ contained in the international application as filed.
- ☒ filed together with the international application in electronic form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US07/77300

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
See the lack of unity section of the International Search Report (Form PCT/ISA/210)

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-50 with respect to SEQ ID NO:3-6

65

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US07/77300

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims <u>1-50</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims <u>1-40,43,45-50</u>	YES
	Claims <u>41,42,44</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims <u>1-50</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-50 have novelty.

Claims 41, 42 and 44 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Cohen et al (US 2005/0114915 A1) in view of Parma et al (US 6,001,988) and Barbera-Guillem et al (US 6,126,835). Cohen teaches a method of separating X and Y sperm cells by binding one or the other with specific binding agents, such as antibodies (para [0041], [0064]). Parma teaches how to make aptamers, and specifically contemplates aptamers to sperm cells (col 3, lines 15-19; col 7, lines 64-66). Barbera-Guillem teaches the equivalence of antibodies and aptamers as binding agents (paragraph bridging col. 3-4). It would have been obvious to substitute aptamers for the antibodies used in Cohen's method, which would have resulted in the claimed invention. It is noted that these claims are not limited to the disclosed SEQ ID NO:3-6.

Claims 1-40, 43 and 45-50 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest SEQ ID NO:3-6 as aptamers for binding sperm cells. SEQ ID NO:3-6 are not disclosed in the prior art.

Claims 1-50 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

66

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US07/77300

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the questions whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 1-40, 43 and 45-50 are objected to as lacking clarity under PCT Rule 66.2(a)(v) because the claims are not fully supported by the description. The application, as originally filed, did not describe: all nucleotide sequences that are "substantially homologous to" and have "substantially the same ability to bind" target molecules on sperm cells as SEQ ID NO:3-6. The binding property or an aptamer is unpredictable, and the disclosure does not describe the particular structural or sequence elements required for this property.

Claims 1-40, 43 and 45-50 are objected to under PCT Rule 66.2(a)(v) as lacking clarity under PCT Article 6 because claims are indefinite for the following reason(s): it is not clear what would constitute "substantially homologous" or "substantially the same ability to bind". Substantially is a relative term, and there is no indication in the disclosure as to the degree necessary to meet the "substantially" requirement.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITYTo:
JAYME A. HULEATT
COOLEY GODWARD KRONISH LLP
1200 19TH STREET, N.W., SUITE 500
WASHINGTON, DC 20036**PCT**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) **07 APR 2008**

Applicant's or agent's file reference

BICE-003/01 WO 306509

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US07/77300

International filing date (day/month/year)

30 August 2007 (30.08.2007)

Priority date (day/month/year)

30 August 2006 (30.08.2006)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(8): A61K 31/70(2006.01);C07H 21/02(2006.01);C12Q 1/68(2006.01)

USPC: 514/44;536/23.1;435/6

Applicant

BIOCERN, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/ US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201

Date of completion of this opinion

19 March 2008 (19.03.2008)

Authorized officer

SAMUEL WOOLWINE

Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (April 2007)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US07/77300

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a)).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☒ on paper
- ☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☒ contained in the international application as filed.
- ☒ filed together with the international application in electronic form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US07/77300

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
See the lack of unity section of the International Search Report (Form PCT/ISA/210)

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-50 with respect to SEQ ID NO:3-6

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US07/77300

Box No. V. Reasoned statement under Rule 43 bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims <u>1-50</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims <u>1-40,43,45-50</u>	YES
	Claims <u>41,42,44</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims <u>1-50</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-50 have novelty.

Claims 41, 42 and 44 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Cohen et al (US 2005/0114915 A1) in view of Parma et al (US 6,001,988) and Barbera-Guillem et al (US 6,126,835). Cohen teaches a method of separating X and Y sperm cells by binding one or the other with specific binding agents, such as antibodies (para [0041], [0064]). Parma teaches how to make aptamers, and specifically contemplates aptamers to sperm cells (col 3, lines 15-19; col 7, lines 64-66). Barbera-Guillem teaches the equivalence of antibodies and aptamers as binding agents (paragraph bridging col. 3-4). It would have been obvious to substitute aptamers for the antibodies used in Cohen's method, which would have resulted in the claimed invention. It is noted that these claims are not limited to the disclosed SEQ ID NO:3-6.

Claims 1-40, 43 and 45-50 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest SEQ ID NO:3-6 as aptamers for binding sperm cells. SEQ ID NO:3-6 are not disclosed in the prior art.

Claims 1-50 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US07/77300

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the questions whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 1-40, 43 and 45-50 are objected to as lacking clarity under PCT Rule 66.2(a)(v) because the claims are not fully supported by the description. The application, as originally filed, did not describe: all nucleotide sequences that are "substantially homologous to" and have "substantially the same ability to bind" target molecules on sperm cells as SEQ ID NO:3-6. The binding property or an aptamer is unpredictable, and the disclosure does not describe the particular structural or sequence elements required for this property.

Claims 1-40, 43 and 45-50 are objected to under PCT Rule 66.2(a)(v) as lacking clarity under PCT Article 6 because claims are indefinite for the following reason(s): it is not clear what would constitute "substantially homologous" or "substantially the same ability to bind". Substantially is a relative term, and there is no indication in the disclosure as to the degree necessary to meet the "substantially" requirement.

MÉTODOS PARA SEPARACIÓN DE CÉLULAS DE ESPERMA Y
COMPOSICIONES QUE CONTIENEN APTÁMEROS O SECUENCIAS DE ÁCIDO
NUCLEICO PARA USO EN ELLOS

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 60/824,069, presentada el 30 de agosto de 2006, que queda
10 incorporada aquí en su totalidad por medio de esta referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

15 La presente invención se refiere a métodos y composiciones para identificar y separar células de una población de células; en particular células de esperma de mamíferos, mediante el uso de ácidos nucleicos, en particular aptámeros, que se unen específicamente, con
20 elevada afinidad y especificidad o preferencia, a las células de esperma que contienen el cromosoma X o bien el cromosoma Y.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25 La capacidad de seleccionar células de esperma que tengan características deseadas, sigue siendo un objetivo importante en la reproducción artificial. Un proceso eficiente, y de costo razonable, para identificar y

separar células de esperma para la selección de sexo, tendría implicaciones económicas de importancia para la industria ganadera y, en particular, para la industria de la carne y la leche. Por ejemplo, en la industria de la carne, los toros machos tienen mayor valor comercial que el ganado hembra, debido a su tamaño; así que los métodos que permitieran el enriquecimiento de toros machos proveería una ventaja competitiva clara a los ganaderos que usaran dichas técnicas. Por otra parte, en la industria lechera, generalmente son más deseables las vacas productoras de leche. Sin embargo, en la actualidad, solamente un porcentaje pequeño de los ganaderos emplea métodos de inseminación artificial que impliquen células de esperma específicas para el sexo, como medio para producir ganado que tenga el sexo deseado. Pese a las ventajas de poder controlar y planificar la constitución sexual del ganado existente, dicho enfoque no es usado más ampliamente en la industria debido a que los métodos actuales para clasificar las células de esperma a células de esperma específicas para el sexo, que emplean técnicas de citometría en flujo, son costosos e involucran el teñido irreversible de las células de esperma antes de la inseminación. También tendrían aplicaciones importantes en muchas tecnologías reproductoras animales y humanas los métodos menos costosos e intrusivos para identificar y separar las células, con base en la calidad de la célula de esperma y las características físicas o el contenido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención provee por lo menos un aptámero o secuencia de ácido nucleico que se une a una
5 molécula de blanco o destino, accesible desde la superficie
de una célula, en particular una célula de espermatozoide de
mamífero, y a un método para producir aptámeros o secuencia
de ácido nucleico. El método comprende poner en contacto
10 una colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con
la molécula de blanco o destino, bajo condiciones
favorables para la unión entre al menos una de las
moléculas de ácido nucleico y la molécula de blanco o
destino, para formar por lo menos un complejo que comprende
15 la molécula de ácido nucleico unida a la molécula de blanco
o destino; donde cada una de las moléculas de ácido
nucleico comprende por lo menos un segmento de secuencias
de nucleótidos tomadas al azar. Luego se separan los
complejos de las moléculas de ácido nucleico sin unir y de
las moléculas de blanco o destino no unidas, y se recupera
20 la molécula de ácido nucleico unida, del complejo separado.

La presente invención provee además una o más
moléculas de ácido nucleico o aptámeros, más específicos,
de preferencia un oligonucleótido, más preferible, una
molécula de ADN, que se une preferentemente a una célula de
25 espermatozoide que contiene un cromosoma X (en lo sucesivo
denominada "célula de espermatozoide X"), o bien a una célula de
espermatozoide que contiene un cromosoma Y (en lo sucesivo
denominada "célula de espermatozoide Y") y, de preferencia, se une
preferentemente mejor a una de las células de espermatozoide X o

75

se une con afinidades significativamente diferentes a cada tipo de células de esperma X e Y.

La presente invención provee también una secuencia de ácido nucleico aislada, que no ocurre en la naturaleza, o aptámero, que se une a una molécula de blanco o destino en una célula de esperma de mamífero que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 3-35, o una porción de ella que se una a la molécula de blanco o destino.

La presente invención provee también un método para usar los aptámeros o secuencia de ácido nucleico para identificar, seleccionar y separar, células de esperma X e Y. De preferencia, el método comprende separar las células de esperma de mamífero poniendo en contacto las células de esperma X e Y con al menos un aptámero de la invención y separar las células en dos o más poblaciones, con base en su capacidad para unirse preferentemente al aptámero.

La invención incluye adicionalmente la(s) población(es) de células de esperma X e Y producidas mediante el método de separación. La invención comprende adicionalmente un estuche de inseminación artificial que comprende la población de células de esperma producida mediante el método de la invención, y un método de inseminación artificial para un mamífero, administrando la población de células de esperma seleccionada al mamífero.

La presente invención provee también medios de diagnóstico y tecnológicos que se relacionan con calidades

de las células de esperma, tales como la viabilidad de la célula de esperma, su motilidad, su funcionalidad, su estimulación y su preservación, así como medios de diagnóstico y tecnológicos que están dirigidos a las tasas de inseminación, las tasas de fertilización y las tasas de nacimiento de productos deseables, estableciendo un método para clasificar selectivamente el semen o las células de esperma obtenidas de diversas especies, individuos y especímenes.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

La figura 1 es una gráfica de citometría en flujo que muestra la especificidad de grupos o colecciones de aptámeros de ADN con respecto a espermatozoides de toro vivos, clasificados, después de nueve rondas de selección de aptámero (células de semen de toro clasificadas A = Y que se unen a un banco de ADN simple; células de semen de toro clasificadas B = Y que se unen a la colección de aptámeros específica para las células X; células de semen de toro clasificadas C = X, que se unen a un banco de ADN simple, y células de semen de toro clasificadas D = X, que se unen a la colección de aptámeros específicos para células X).

25

La figura 2A muestra el análisis de unión de la colección enriquecida de aptámeros específicos para células X. Imágenes confocales de fluorescencia de células de esperma (izquierda) e imágenes ópticas de células de esperma (derecha. (a) colección de aptámeros específica

para X, con las células X; (b) colección de aptámeros específica para X con las células Y; (c) banco de ADN simple, con células X.

5 La figura 2B muestra el análisis de unión de la colección enriquecida de aptámeros específicos para las células Y. Imágenes confocales de fluorescencia de células de esperma (izquierda); e imágenes ópticas de células de esperma (derecha). (a) Colección de aptámeros específicos para Y, con las células Y; (b) colección de aptámeros
10 específicos para Y, con las células X; (c) banco de ADN simple con células Y.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Dentro del contexto de la presente invención, se definen los aptámeros como una clase de ligandos o secuencias de ácido nucleico, términos éstos que son usados de manera intercambiable en toda esta memoria descriptiva, y a los que se hace referencia también como oligómeros u
20 oligonucleótidos, es decir, ácidos nucleicos que se unen preferentemente a una molécula de blanco o destino en particular, tal como un polipéptido, un péptido corto, una enzima, una proteína, un lípido, un glicolípido, un fosfolípido, una glicoproteína, un carbohidrato, una
25 molécula pequeña o una molécula superficial de una célula, tal como un receptor, una matriz extracelular o una molécula de apoyo o un canal de iones. Los aptámeros de la presente invención son ligandos u oligonucleótidos de un solo filamento que se unen con elevada afinidad y

especificidad a moléculas de blanco o destino, por interacciones de formas complementarias. Los aptámeros o secuencias de ácido nucleico de la presente invención son capaces de unirse o de formar un complejo con una molécula de blanco o destino, en un grado o afinidad mayores que con el que el aptámero se uniría a moléculas contaminantes o de control que, presumiblemente, no contienen el blanco en la superficie de, o accesible desde la superficie de, una célula de esperma X o Y. Los aptámeros o secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden unirse preferentemente a una molécula de blanco o destino en la superficie de la célula de esperma X, en comparación con la célula de esperma Y, o viceversa. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN, de un solo filamento o de doble filamento, y cualquier modificación química de ellos. Las modificaciones incluyen, pero sin limitación a ellas, las que proveen otros grupos químicos que incorporan carga adicional, capacidad de ser polarizados, unión de hidrógeno, interacción electrostática, capacidad de flujo o un marcador para las bases de ácido nucleico o para la molécula de ácido nucleico como un todo. De preferencia, los aptámeros son moléculas de ADN. Es muy preferible que sean oligonucleótidos.

La longitud de estas moléculas es mayor que un nucleótido y pueden incluir secuencias cortas, tales como dímeros o trímeros, que pueden ser intermediarios en la producción de moléculas específicas de ácido nucleico que se unan a un blanco. Los aptámeros de la presente invención incluyen moléculas de ácido nucleico de cualquier

longitud, pero de preferencia de menos de 200 nucleótidos, de preferencia menos de 150 nucleótidos, más preferible, menos de 100 nucleótidos, todavía más preferible, menos de 80 nucleótidos, más preferible aún, menos de 60 nucleótidos, más preferible, menos de 40 nucleótidos, todavía más preferible, menos de 35 nucleótidos, más preferible aún, menos de 30 nucleótidos; de preferencia menos de 25 nucleótidos, más preferible, menos de 20 nucleótidos, más preferible aún, menos de 15 nucleótidos y todavía más preferible, menos de 10 nucleótidos. Típicamente, los oligonucleótidos tienen una longitud de alrededor de 15 a 60 nucleótidos.

Dentro del contexto de la presente invención, se entiende que los aptámeros incluyen tanto aptámeros monoclonales cuanto aptámeros policlonales. Tal como se usa aquí, los aptámeros monoclonales son aquellos que tienen las mismas secuencias de nucleótidos que se unen al mismo blanco; y los aptámeros policlonales son aquellos que tienen alguna variación en las secuencias de nucleótidos, que se unen al mismo blanco. Se prefieren los aptámeros monoclonales. Tal como se usa aquí, un aptámero de preferencia es un oligonucleótido que es capaz de formar complejo con, o de unirse a, una molécula de blanco o destino, tal como se describe aquí. La afinidad o la capacidad de formar complejos de un aptámero con su molécula de blanco o destino, es un asunto de grado, y se mide por la capacidad del aptámero para unirse a la molécula de blanco a un grado mayor que a moléculas de control o de contaminación. De esa manera, la

especificidad de los aptámeros es similar, en significado, a la especificidad como se aplica a los anticuerpos.

Una vez que se identifican los aptámeros útiles que se unen a, pero de preferencia ya sea a las células de
5 esperma X o bien a las células de esperma Y, mediante uno de los métodos descritos en la presente, se pueden preparar los aptámeros mediante cualquier método conocido para producir moléculas de ácido nucleico, tales como los métodos de síntesis, recombinantes y de purificación.
10 Adicionalmente, se pueden vincular los aptámeros con otras moléculas para ayudar a la detección y/o el aislamiento, después de poner en contacto el aptámero con las células de esperma. Es importante que esta molécula adicional no afecte significativamente, ni interfiera con, la afinidad
15 de unión del aptámero a la molécula de blanco o destino. Los marcadores útiles incluyen los marcadores conocidos por ser útiles para el aislamiento y la detección de proteínas, péptidos, metabolitos y anticuerpos, tales como las porciones fluorescentes o de biotina o las perlas
20 magnéticas u otros tipos de perlas útiles para el aislamiento.

Se pueden usar los aptámeros o secuencias de ácido nucleico de la presente invención solos o en combinación con otros aptámeros específicos para la misma
25 molécula de blanco o destino. Se conocerían diferentes aptámeros que contendrían el mismo consenso a partir de la comparación de dos o más aptámeros conocidos, para una molécula de blanco o destino específica o, posiblemente, otra molécula de blanco o destino en o cerca de la

81

superficie de una célula de esperma X o Y. Si se van a separar las células de esperma X e Y, es importante emplear uno o más aptámeros específicos o preferentes para una célula o la otra, a fin de proveer la mejor separación para
5 obtener una población de esperma que contenga células de esperma X o células de esperma Y.

Los aptámeros para las proteínas de la superficie de la célula de esperma u otros blancos de la superficie de la célula de esperma (incluyendo, pero sin limitación a
10 ellos: carbohidratos, lípidos, nucleótidos y otras moléculas pequeñas que pueden ser accesibles para unirse a aptámeros específicos) son identificados y seleccionados mediante los métodos de la presente invención. En una modalidad, la invención provee un método para producir un
15 aptámero que se une a una molécula de blanco o destino en la superficie de una célula de esperma de mamífero. Se pone en contacto una colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con una molécula de blanco que esté accesible para unión con esta moléculas, probablemente en
20 la superficie de la célula o sobresaliendo de la superficie de la célula, bajo condiciones favorables para unirse entre por lo menos una de las moléculas de ácido nucleico y la molécula de blanco o destino. Cada una de las moléculas de ácido nucleico contiene por lo menos un segmento de
25 secuencias de nucleótidos dispuestas al azar. Esto provee variación en las moléculas de ácido nucleico. El contacto da por resultado la formación de por lo menos un complejo que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico unida a la molécula de blanco. Luego se separan los

complejos de las moléculas de ácido nucleico sin unir y de las moléculas de blanco o destino no unidas. Entonces se recupera la molécula de ácido nucleico unida del complejo separado, proporcionando de esa manera el aptámero deseado.

- 5 En una modalidad adicional, el método comprende el paso adicional de amplificar las moléculas de ácido nucleico recuperadas para crear moléculas adicionales. En otra modalidad preferida adicional, las moléculas recuperadas y amplificadas, es decir, los aptámeros, son mezclados
- 10 ulteriormente con la colección de células de esperma X e Y que contienen moléculas de blanco accesibles para unirse, de preferencia en, o accesibles desde, la superficie de la célula; y se repite la secuencia de pasos señalada más arriba, un número de veces suficiente hasta que se
- 15 recuperen aptámeros que tengan una especificidad / preferencia deseada y una afinidad de unión deseada. Los aptámeros se unen más específicamente con una molécula de blanco o destino en una célula, en comparación con un combinado de control de secuencias de ADN para la misma
- 20 célula. En una modalidad alternativa el paso de poner en contacto comprende incubar las moléculas para formar una mezcla de equilibrio, y el paso de separar comprende electroforesis capilar.

- De preferencia la molécula de blanco o destino en
- 25 la superficie de una célula es una que es única ya sea para una célula de esperma X o para una célula de esperma Y, y que no reaccione cruzadamente con cada uno de los tipos de células. Dicha molécula de blanco o destino puede ser una proteína, un péptido, una enzima, un lípido, un

63

glicolípido, un fosfolípido, una glicoproteína, un carbohidrato, una molécula pequeña o una molécula de la superficie de la célula, tal como un receptor, una matriz extracelular, una molécula de apoyo o un canal de iones.

- 5 Es muy preferible que la proteína distinga las células de esperma X de las células de esperma Y que contienen un cromosoma Y.

- En una modalidad de la invención se llevan a cabo los métodos de la invención de una manera iterativa, de modo que hay pasos repetidos de: (a) poner en contacto una
- 10 colección de diferentes ácidos nucleicos (o sea, aptámeros) con una molécula de blanco o destino, accesible desde la superficie de una célula, para formar por lo menos un complejo que comprende por lo menos una molécula de ácido
- 15 nucleico unida a una molécula de blanco o destino, accesible desde la superficie de una célula; (b) separar los complejos de las moléculas de ácido nucleico no unidas y de las moléculas de blanco o destino sin unir; y (c) recuperar la molécula de ácido nucleico unida, del complejo
- 20 separado. En esta modalidad, la pluralidad de aptámeros recuperados del complejo separado en el paso (c) es usada en una ronda subsiguiente del método, en el paso (a). En una modalidad de la invención se repiten los pasos de clasificar las células de esperma (es decir, los pasos (a),
- 25 (b) y (c) anteriores) una o más veces, dos o más veces, tres o más veces, cuatro o más veces, cinco o más veces, seis o más veces, siete o más veces, ocho o más veces, nueve o más veces, 10 o más veces u once o más veces, para producir un combinado de aptámeros específicos para las

células de esperma X o para las células de esperma Y. Se pueden purificar los aptámeros clasificados mediante métodos conocidos en la técnica y secuenciados mediante métodos conocidos, o por un proveedor comercial.

- 5 Los aptámeros producidos mediante el método descrito en la presente comprenden una secuencia aislada de ácido nucleico que no ocurre en la naturaleza, que se une a una molécula de blanco o destino en una célula de esperma de mamífero, que comprende una secuencia de nucleótidos, seleccionada del grupo que consiste de:
- 10

(a) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 3-35, o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino;

- (b) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homóloga a, y que tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la molécula de blanco o destino de la célula de esperma, que la secuencia de nucleótidos de (a), o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino; y
- 15

- (c) una secuencia de nucleótidos que tiene sustancialmente la misma estructura y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la molécula de blanco o destino en la célula de esperma, que la secuencia de nucleótido de (a) o de (b), o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino.
- 20
- 25

La secuencia aislada de ácido nucleico que no ocurre en la naturaleza, que se describe en lo que antecede, también comprende por lo menos una porción en la que por lo menos una porción de los nucleótidos 1 a 20

45

están omitidos de las SEQ ID NO: 3-35, o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino; por lo menos una porción de los nucleótidos 61-80 están omitidos de las SEQ ID NO: 3-10 y 12-35, o de los nucleótidos 44-63 de SEQ ID NO. 11, o una porción de ellos que se une a una molécula de blanco o destino; por lo menos una porción de los nucleótidos 1-20 está omitida de las SEQ ID NO: 3-35 y/o donde por lo menos una porción de los nucleótidos 61-80 está omitida de las SEQ ID NO: 3-10 o 12-35 o los nucleótidos 44-63 de SEQ ID NO: 11, o una porción de ellos que se une a una molécula de blanco; y las secuencias de ADN comprenden los nucleótidos 21-60 de las SEQ ID NO: 3-10 o 12-35 o los nucleótidos 21-43 de SEQ ID NO: 11, o una porción de ellos que se une a una molécula de blanco o destino.

La presente invención comprende también una composición que comprende por lo menos una de las secuencias de ácido nucleico, seleccionada del grupo que consiste de todas las secuencias de ácido nucleico enumeradas en los dos párrafos inmediatamente precedentes.

El método de la presente comprende adicionalmente el paso de amplificar la molécula recuperada de ácido nucleico para crear moléculas adicionales de ácido nucleico. El paso (a) de poner en contacto puede comprender incubar las moléculas para formar una mezcla de equilibrio; y donde el paso de separación comprende electroforesis capilar.

El método de la presente comprende adicionalmente incubar la colección de diferentes moléculas de ácido

nucleico o aptámeros, después de cada ronda, y las células de esperma que contienen la molécula de blanco, con un sensibilizador que es sustancialmente complementario de la secuencia de ácido nucleico que sirve de plantilla. La

5 plantilla de secuencia de ácido nucleico es una secuencia que corresponde a un segmento del aptámero que no ha variado (que es constante) dentro de una pluralidad de aptámeros. De preferencia, el aptámero es de un banco de ADN, y la secuencia de ácido nucleico que sirve de

10 plantilla es una secuencia vectora. El paso de poner en contacto (a) comprende adicionalmente un paso de selección negativa, seguido por un paso de selección positiva. Se cuantifica la pluralidad de los aptámeros recuperados usando la técnica conocida de citometría en flujo.

15 La molécula de blanco en la célula de esperma, a la que se puede unir el aptámero, está seleccionada del grupo que consiste de una proteína, un péptido, una enzima, un lípido, un glicolípido, un fosfolípido, una glicoproteína, un carbohidrato, una molécula pequeña o una

20 molécula en la superficie de la célula. En una modalidad preferida, la molécula de blanco o destino es una molécula de blanco o destino contenida en una célula de esperma, y la molécula de blanco o de destino distingue por lo menos una célula de esperma X de por lo menos una célula de

25 esperma Y, mediante una comparación de la unión o no unión o una unión diferencial. Las células de esperma identificadas mediante este método son células de esperma de ganado o células de esperma humanas.

Se pueden identificar los aptámeros que se unen

87

específicamente a células de esperma mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación a ellas, técnicas de clasificación de células y técnicas de citometría en flujo. El método de la presente provee un

5 método para preparar aptámeros que permite la separación de células de esperma X de mamífero de células de esperma Y de mamífero; donde el método produce un primer grupo de aptámeros que se unen a las células de esperma X en la primera muestra y un segundo grupo de aptámeros que se une

10 a las células de esperma Y en la segunda muestra; y el método comprende adicionalmente: (d) comparar los grupos primero y segundo de aptámeros para identificar por medio de eliminación de proceso por lo menos un aptámero que se une únicamente a las células de esperma X o bien a las

15 células de esperma Y. Las muestras primera y segunda de células de esperma de mamífero son producidas mediante citometría en flujo y clasificación de células.

El método para preparar los aptámeros específicos para el esperma comprende un paso de poner en contacto (a)

20 que comprende: (a1) poner en contacto una primera colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con una molécula de blanco contenida en una primera muestra de células de esperma X de mamífero, bajo condiciones favorables para la unión entre las moléculas de ácido nucleico y las células

25 de esperma X, para formar por lo menos un complejo que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico unida a por lo menos una célula de esperma X; donde cada una de las moléculas de ácido nucleico comprende por lo menos un segmento de secuencias de nucleótido aleatorizadas; y (a2)

poner en contacto una segunda colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con una molécula de blanco o destino, contenida en una segunda muestra de células de esperma Y de mamífero, bajo condiciones favorables para la

5 unión entre las moléculas de ácido nucleico y las células de esperma Y para formar por lo menos un complejo que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico unida a por lo menos una célula de esperma Y; donde cada una de las moléculas de ácido nucleico comprende por lo menos un

10 segmento de secuencias de nucleótido aleatorizadas; donde el paso de separación (b) y el paso de recuperación (c) producen de esa manera aptámeros para las células de esperma X y aptámeros para las células de esperma Y. Los aptámeros recuperados mediante este método son aquellos que

15 se unen a las células de esperma X y aquellos que se unen a las células de esperma Y.

El método para producir aptámeros específicos para esperma comprende adicionalmente que, antes del paso (a), ocurra por lo menos una ronda de contacto de las

20 moléculas de ácido nucleico con una población de células sin clasificar, que comprende tanto células de esperma X de mamífero cuanto células de esperma Y de mamífero. También el paso de separación (b) comprende adicionalmente el paso de separar las células de esperma unidas al aptámero, del

25 aptámero; y el paso de recuperación (c) comprende adicionalmente recuperar las células de esperma separadas. Las células de esperma de mamífero de preferencia son células de esperma de ganado o células de esperma de humano.

En una modalidad de la invención, se pueden llevar a cabo rondas de selección de aptámero sin clasificar, antes de las rondas de selección de células de esperma X e Y sin clasificar / aptámero. Por ejemplo, se pueden efectuar de 1 a 5 rondas de selección de aptámero sin clasificar. La invención incluye métodos que comprenden tres rondas de selección de aptámero sin clasificar, antes de las rondas de selección de aptámero clasificado. El método de la reivindicación 1 comprende adicionalmente incubar la colección de diferentes moléculas de ácido nucleico y la molécula de blanco o destino con un sensibilizador, que sea sustancialmente complementario con la secuencia de ácido nucleico de plantilla.

En una modalidad alternativa y preferida, la invención provee un método para producir un aptámero que permita la separación de células de esperma X de las células de esperma Y. Se obtiene una primera muestra de células de esperma X y se obtiene una segunda muestra de células de esperma Y. Se produce un primer grupo de aptámeros, que se unen a las células de esperma X de la primera muestra; y se produce un segundo grupo de aptámeros que se unen a las células de esperma Y de la segunda muestra. Se comparan los grupos primero y segundo de aptámeros para identificarlos mediante un proceso de eliminación de por lo menos un aptámero que se une ya sea a las células de esperma X o bien a las células de esperma Y. Por lo general se identifican varios aptámeros diferentes que se unen a uno u otro de los tipos de células.

De preferencia se producen las muestras primera y

segunda de células de esperma de mamífero, que contienen células de esperma Y o bien células de esperma X, mediante técnicas de citometría en flujo y técnicas de clasificación de células, que son conocidas por quienes tienen experiencia en la materia. Dichas técnicas están descritas en la patente estadounidense No. 5,135,759, expedida el 4 de agosto de 1992. Por lo general un citómetro de flujo mide la cantidad de luz fluorescente desprendida cuando el esperma, tratado previamente con un tinte fluorescente, pasa a través de un rayo láser. El tinte se une al ADN. Debido a que el cromosoma X contiene más ADN que el cromosoma Y, el esperma hembra (X) absorbe más tinte y desprende más luz fluorescente que el esperma macho (Y). Para detectar las pequeñas diferencias en el ADN entre el esperma X y el esperma Y, el esperma pasa en una sola fila a través del rayo láser, que mide el contenido de ADN del esperma individual. Esto permite la separación de las células individuales de esperma X e Y, mediante un clasificador de células. Se pueden adquirir células de esperma X e Y clasificadas de fuentes comerciales, que habían sido clasificadas usando métodos similares de clasificación de células.

De preferencia se producen los aptámeros mediante un proceso que comprende los pasos de: (a) poner en contacto una primera colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con una primera muestra de células de esperma Y bajo condiciones favorables para unirse entre las moléculas de ácido nucleico y las células de esperma Y para formar por lo menos un complejo que comprende por lo menos

- una molécula de ácido nucleico unida a por lo menos una célula de esperma que lleva el cromosoma Y; donde cada una de las moléculas de ácido nucleico comprende por lo menos un segmento de secuencias de nucleótido aleatorizadas; (b)
- 5 poner en contacto una segunda colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con la segunda muestra de células de esperma X bajo condiciones favorables para la unión entre las moléculas de ácido nucleico y las células de esperma X, para formar por lo menos un complejo que
- 10 comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico unida a por lo menos una célula de esperma X; donde cada una de las moléculas de ácido nucleico comprende por lo menos un segmento de secuencias aleatorizadas de nucleótidos; (c)
- separar los complejos de las moléculas de ácido nucleico sin unir y de las moléculas de blanco o destino no unidas;
- 15 y (d) recuperar las moléculas de ácido nucleico unidas, de los complejos; produciendo de esa manera aptámeros para células de esperma Y, y aptámeros para células de esperma X.

- 20 En una modalidad preferida se prueban los aptámeros y se validan poniéndolos en contacto con una muestra de células de esperma que contenga células de esperma X y células de esperma Y, separando las células de esperma mediante citometría en flujo y clasificación de las
- 25 células, y determinando que el aptámero que se une putativamente a X, se une a la célula de esperma X; y que el aptámero que se une putativamente a Y, se une a la célula de esperma Y. Por lo general se marcan los aptámeros, por ejemplo, con una porción fluorescente para

permitir la identificación apropiada.

Al producir los aptámeros de la invención se pueden usar diversas técnicas específicas, conocidas por quienes tienen experiencia en la materia. Una de esas técnicas es el proceso MonoLex de AptaRes, Luckenwalde, Alemania. El proceso comprende los pasos de: (1) síntesis de un banco de oligonucleótidos con regiones de secuencia aleatoria; (2) adsorción por afinidad de los oligonucleótidos a un blanco; (3) clasificación por afinidad de los oligonucleótidos junto con una resina de afinidad; (4) separación de los oligonucleótidos con diferentes niveles de afinidad a numerosos combinados que comprenden aptámeros múltiples por combinado; (5) amplificación de los combinados de nucleótidos separados (lo que produce aptámeros policlonales); y (6) identificación de oligonucleótidos individuales por clonación y secuenciación (lo que produce aptámeros monoclonales).

Otra técnica es conocida como el proceso SELEX (Evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial). El proceso SELEX y sus variantes están descritos en las patentes estadounidenses No. 5,861,254; 6,261,774 B1, 6,376,190 B1, 6,506,887 B1; 6,706,482 B2 y 6,730,482 B2. Este proceso incluye los pasos de: (1) poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos, que comprenden preferentemente segmentos de secuencias aleatorizadas, con un blanco, bajo condiciones favorables para la unión; (2) dividir los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido específicamente a

moléculas de blanco o destino; (3) disociar los complejos de ácido nucleico-blanco; (4) amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-blanco, para producir una mezcla enriquecida en ligando, de ácidos nucleicos; y (5) repetir los pasos previos a través de tantos ciclos como se desee o sean necesarios, para producir aptámeros altamente específicos y de elevada afinidad, para la molécula de blanco o destino.

Un proceso relacionado es el proceso CE-SELEX (SELEX con electroforesis capilar) que está descrito en *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 20-21. Esta técnica usa la electroforesis para separar las secuencias de unión de las inactivas. Ocurre la selección en solución libre. Las secuencias activas que se unen al blanco sufren de un cambio en la movilidad, similar al que se observa en la electroforesis capilar por afinidad. Se separan las secuencias activas de las secuencias inactivas y se recogen como fracciones separadas.

Un método preferido para identificar y aislar los aptámeros es el proceso NECEEM (Electroforesis capilar sin equilibrio de mezclas de equilibrio), como se describe en *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 13674-13675; *Anal. Chem.*, 2003, 75, 1382-1386; Krylov, *NECEEM for Development, Characterization and Analytical Utilization of Aptamers*, Lab. Plus International, noviembre de 2005, y Krylov, *Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures (NECEEM): A Novel Method for Biological Screening*, *J. Biomol. Screen Online First*, 17 de enero de 2006.

Brevemente, este método se inicia con un banco de

AND simple (cada secuencia es estadísticamente única) que se mezcla con la proteína de blanco o destino y se incuba para formar una mezcla de equilibrio. Las moléculas de ADN con gran afinidad se unen a la proteína de blanco o destino; mientras que las que tienen baja afinidad no se unen. Se introduce entonces un tapón de la mezcla de equilibrio en un capilar y se le aplica alto voltaje. La fracción de equilibrio de ADN-blanco se separa de la fracción de equilibrio de ADN mediante electroforesis en capilar libre de gel, bajo condiciones que no sean de equilibrio. Bajo esas condiciones, la movilidad del blanco es mayor que la del ADN, y la movilidad del complejo blanco-ADN típicamente es intermedia entre la del ADN y la del blanco. En el campo eléctrico, por lo tanto, las zonas están separadas, y ya no se mantiene el equilibrio entre los tres componentes. El complejo de ADN-blanco comienza a disociarse, lo que da por resultado "embarraduras" de ADN y blanco entre los tres picos. Debido a la elevada eficiencia de separación, es despreciable la reconexión del ADN disociado y el blanco.

Los componentes llegan al extremo del capilar en el siguiente orden: (a) la parte de equilibrio del blanco libre; (2) el blanco libre formado por la disociación de ADN-blanco durante el NECEEM; (3) los restos de ADN intacto-blanco; (4) el ADN libre formado a partir de la disociación de ADN-blanco durante el NECEEM; y (5) la parte de equilibrio del ADN libre. Se recoge una fracción desde la salida del capilar en una ventana de tiempo. La ventana de recolección de aptámero más ancha incluye los complejos

de ADN-blanco y el ADN disociado de los complejos de ADN-blanco, durante el NECEEM.

Los blancos preferidos son polipéptidos (péptidos y proteínas) en las células de espermatozoides que son específicas para el sexo o que permiten de otra manera la identificación o la separación del espermatozoides con base en la selección de sexo u otras características deseadas. Son ejemplos de dichos polipéptidos los descritos en las patentes estadounidenses No. 4,191,749, 4,448,767, 5,021,244, 6,153,373 y 6,480,092; y en la publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2003/0162238 A1. Por ejemplo, la solicitud de patente publicada describe una proteína aislada, específica para cromosoma de sexo, caracterizada como sigue: (a) específica para cromosoma X; (b) asociada con la membrana de célula de las células de espermatozoides bovino; y (c) que tiene un peso molecular, en SDS-PAGE, de alrededor de 32 kDa.

Una vez que se seleccionan los aptámeros adecuados, pueden ser producidos y reproducidos mediante muchas técnicas bien conocidas por quienes tengan experiencia ordinaria en la materia, incluyendo técnicas enzimáticas, o por medio de síntesis química. Se pueden añadir otros grupos químicos por medio de técnicas químicas conocidas. Dichos grupos incluyen fluoresceína o biotina y otros grupos que crean una señal detectable. Adicionalmente, se pueden usar nucleótidos modificados para proteger los aptámeros contra la degradación por nucleasas. Esos nucleótidos modificados incluyen los derivados 2'-O-metilo y 2'-fluoro.

En algunas modalidades, los aptámeros seleccionados y/o producidos como se describe más atrás serán usados en un análisis para separar las poblaciones de células de esperma, con base en si llevan el cromosoma X o el cromosoma Y, un número anormal de cromosomas de sexo u otras características deseadas de las células de esperma. En una modalidad preferida, el método para separar las células de esperma de mamífero comprende los pasos de: 1) poner en contacto las células de esperma de mamífero con el aptámero de la invención; y 2) separar las células de esperma a dos o más poblaciones, con base en la capacidad de las células de esperma para unirse al aptámero. En una modalidad, el método comprende el paso adicional de separar las células de esperma unidas al aptámero, del aptámero; y recuperar las células de esperma separadas. En otra modalidad se recuperan las células de esperma que no están unidas al aptámero.

En una modalidad alternativa se puede usar más de un tipo de aptámero. Así pues, se puede usar dos o más aptámeros de la invención en el método de separación, y esos aptámeros pueden contener secuencias de consenso que se unen a la misma molécula de blanco o destino. Los aptámeros producidos mediante el método de la presente son útiles para unirse a moléculas de blanco o destino y, más específicamente, a aquellas moléculas de blanco o destino que están en células de esperma, tanto células de esperma X cuanto células de esperma Y.

Este método produce poblaciones de células de esperma seleccionadas y separadas con base en ciertas

97

características deseadas de las células. Se pueden unir o desunir poblaciones separadas, con respecto al aptámero. Si se une la población deseada al aptámero, de preferencia se separan las células de esperma de las moléculas de aptámero. De preferencia, las células de esperma son células de esperma de ganado vacuno. En una modalidad preferida, las células de esperma contienen un cromosoma Y. En una modalidad preferida alternativa, las células de esperma contienen únicamente el cromosoma X.

10 En otra modalidad, la invención provee un método para producir un aptámero o una secuencia de ácido nucleico que permite la separación de células de esperma X de las células de esperma Y. Este aptámero preparado es puesto en contacto con una población mixta de células de esperma X y de esperma Y, y el aptámero se une preferentemente a las células de esperma X; y estos complejos de aptámero-célula de esperma X unidos son separados de la población original de células de esperma mixtas, dejando una población de células de esperma rica en contenido Y. Se puede tratar el complejo de aptámero unido - células de esperma que contienen X para liberar las células de esperma que contienen X, de modo que se puedan aislar como una población de células.

25 Se podría usar un análisis para separar las células de esperma mediante el uso de aptámeros, por ejemplo, de la siguiente manera. Se revisten perlas magnéticas microscópicamente pequeñas, obtenidas en el comercio, con un aptámero de la invención apropiado, tal como aptámeros específicos para esperma X. Esas perlas

serán colocadas en una suspensión de las células de esperma en un receptáculo apropiado, tal como un plato de vidrio. Debido a que están presentes las proteínas específicas para el cromosoma de sexo en la superficie de las células, se

5 unirán entonces las células de esperma X al aptámero específico/preferencial para el esperma X en las perlas; mientras que las células de esperma Y no se unirán o lo harán menos preferentemente. A continuación se ponen a un lado en el plato las perlas usando un imán. Se recuperan

10 entonces las células de esperma que tienen el cromosoma Y. Se pueden usar también otros tipos de perlas para capturar y recuperar los aptámeros. Otras técnicas que utilizan perlas magnéticas revestidas con sustancias que se unen a las células de esperma están descritas en las publicaciones

15 de solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2003/0068654 A1, 2004/0142384 A1 y 2005/0114915 A1.

En otro ejemplo se puede usar la aglutinación de las células de esperma. En esta manera de proceder, se puede suspender esperma vivo, sin clasificar, en un medio

20 de cultivo *in vitro*, libre de suero, y exponerlo a aptámeros específicos / preferenciales para células de esperma Y o X. Después del tratamiento se filtra el medio en un filtro de lana de vidrio y se usa el esperma del filtrado para llevar a cabo la fertilización *in vitro*.

25 En otro ejemplo se pueden unir los aptámeros contra las proteínas de la superficie, específicas para las células de esperma X o Y, a células de esperma X o Y, respectivamente, e inactivarlas, y se puede prevenir la fertilización de un óvulo. Las células de esperma no

unidas por los aptámeros pueden permanecer viables y activas para fertilizar óvulos. De esa manera, la invención provee un método para producir una muestra de semen enriquecida en células de esperma X o Y activas, y por lo tanto, capaces de incrementar la probabilidad de que el producto tenga el sexo deseado o tenga un gen para un trato conectado con un cromosoma de sexo.

En otro ejemplo, se puede exponer una preparación de esperma natural a un aptámero que se una, por ejemplo, a moléculas específicas para Y. Se puede suspender el esperma expuesto junto con un conjugado de un segundo aptámero que una exclusivamente el primer aptámero y un sustrato inmunoabsorbente en un diluyente libre de proteínas, para formar una preparación de conjugado / esperma, con lo que el esperma Y se une al sustrato. Luego se puede recuperar el esperma Y del sustrato mediante unión específica del sustrato.

Los métodos descritos aquí proveen los medios para separar el esperma en factores de calidad y conveniencia, incluyendo la motilidad de las células de esperma, la funcionalidad, la estimulación y la conservación, que pueden afectar las tasas de fertilidad, las tasas de inseminación, las tasas de fertilización, la salud de los productos y la conveniencia de los productos para las diversas especies de mamíferos, incluyendo, pero sin limitación a ellos: humanos, equinos, vacunos, suídeos, gatos, perros, búfalos, otros rumiantes y alces.

Los métodos para separar el esperma sobre la base de características descritas aquí, reduce al mínimo el daño

al esperma por el manejo mecánico, de modo que el esperma tiene viabilidad mejorada. Los métodos son no invasores, no requieren de unión química a estructuras celulares internas, implican un mínimo de manipulación y son de bajo costo. Hay requisitos mínimos en cuanto a equipo o instrumentación, y son efectuados fácilmente por quien tenga experiencia en la materia.

Los aptámeros preparados por el método de la presente, y los métodos de la presente invención, también pueden ser usados para evaluar otras características de la esperma. Por ejemplo, pueden ser usados para determinar la calidad de la esperma, para determinar la fertilidad masculina, para identificar esperma sano o para identificar esperma anormal o dañado.

Las células de esperma separadas de la invención de preferencia son usadas para inseminación artificial de un mamífero. De preferencia el mamífero es un mamífero bovino. El método de inseminación artificial comprende administrar el esperma al mamífero usando técnicas conocidas por los que tienen experiencia en la materia.

La invención comprende adicionalmente un estuche de inseminación artificial para un mamífero. El estuche contiene por lo menos la población de células de esperma separadas de la invención y, opcionalmente, otros componentes o dispositivos para administrar la población de células de esperma al mamífero. De preferencia el estuche contiene la muestra de células de esperma individual en un tubo para inserción en la vagina del animal hembra. Dicho tubo de muestra se conoce en la técnica como "pajilla".

Alternativamente, el espermatozoides separado de la invención puede ser usado para la fertilización *in vitro* de un mamífero. De preferencia, el mamífero es un humano.

5 EJEMPLOS

MÉTODO PARA SELECCIONAR APTÁMEROS PARA ESPERMA

Un método preferido para seleccionar aptámeros específicos, de acuerdo con la presente invención, emplea un método que utiliza varias rondas de incubación de células de espermatozoides X sin clasificar, células de espermatozoides X clasificadas y/o células de espermatozoides Y clasificadas, con un banco de ADN, que incluye un paso final de recolectar la solución con aglutinadores de ADN y usarlo como plantilla para RCP y para la separación de filamentos en gránulos o perlas de estreptavidina. Los inventores han determinado que lo óptimo es seis rondas de selección del aptámero para espermatozoides, de acuerdo con la presente invención. Se lleva a cabo de preferencia siete rondas, más preferible, ocho rondas y todavía más preferible nueve rondas de selección, como se indica más adelante. Sin embargo, se pueden efectuar, de ser necesario, más de nueve rondas de selección para obtener aptámeros que se unan a la molécula de blanco o destino específica. Se debe entender que el protocolo descrito en lo que sigue puede variar en temperatura, volumen y otros parámetros que no afectan el resultado del protocolo, sino que den por resultado la producción de aptámeros específicos que se unan a las moléculas de blanco o destino. Dichas variaciones son

conocidas por las personas con experiencia en la materia.

Rondas 1 a 3 de selección de aptámero

Preparación de las células

5 Se descongela la alícuota de esperma colocando la pajilla en agua a 37 °C durante un minuto y luego se mantienen las células a la temperatura ambiente (20-25 °C) (TA).

1. Se toma una pajilla de células de esperma sin clasificar (alrededor de 0.5 mL y 10^7 células).
- 10 2. Se añade 1 mL del regulador de semen que contiene PVA (alcohol polivinílico).
3. Se centrifugan las células de esperma durante 12 minutos a 300 x g a 17 °C en una ampolla de 1.5 mL.
4. Se retira el regulador y se vuelven a suspender las
15 células en 1 mL de regulador nuevo de PVA-semen.
5. Se centrifugan las células de esperma durante 12 minutos a 300 x g a 17 °C, en una ampolla de 1.5 mL.
6. Se vuelven a suspender las células de esperma en
20 300 µL del regulador nuevo de PVA-semen y se cuentan las células usando un quimiocitómetro. Se diluyen las células a alrededor de 2×10^6 células/mL (40,000 células para 20 µL), añadiendo 600 µL de regulador.
- 25 7. Se fijan 50 µM de banco de ADN simple (pedido según lo necesario, a Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, IA, E. U. A.), con la siguiente secuencia: 5'-CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG (SEQ ID NO: 1)-(40N)-GGC TTC TGG ACTA CC TAT GC (SEQ ID NO:

2)-3', disueltas en PBS (regulador salina regulada con fosfato) con 2.5 mM de $MgCl_2$, calentando a 94 °C durante alrededor de tres minutos; luego se enfría a la temperatura ambiente.

- 5 8. Se añaden 2 μL de F-sensibilizador 1 mM (pedido según la necesidad del cliente del sensibilizador, a IDT, con la siguiente secuencia: 5'-CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG-3') (SEQ ID NO: 1) a las alícuotas de 40 μL de células, hasta una concentración final de 50 μM . El sensibilizador F es uno de los primeros 20 nucleótidos del banco. Se usa en la selección como un ADN de respaldo. Se seleccionó esta secuencia para disminuir la probabilidad de que por lo menos una de las regiones constantes del banco, no participen en la unión, y si se retira produciría una secuencia de aptámero más corta, pero no cambiarían las propiedades de unión.
- 10
- 15 9. Se añaden 4 μL de banco fijado en 100 μM , a la alícuota de 20 μL que contiene las células de esperma con 50 μM de sensibilizador F.
- 20 10. Se incuba durante una hora a la temperatura ambiente.
- 25 11. 11. Se añaden 200 μL de regulador nuevo de PVA-semen y se centrifuga durante 12 minutos a 300 x g a 17 °C.
12. Se elimina el sobrenadante y se vuelve a disolver la pella en otros 200 μL del regulador de PVA-semen.
13. Se centrifuga durante 12 minutos a 300 x g, a 17

°C.

14. Se elimina el sobrenadante y se vuelve a disolver la pella en otros 200 μ L del regulador de PVA-semen.
- 5 15. Se centrifuga durante 12 minutos a 300 x g, a 17 °C.
16. Se elimina el sobrenadante y se añaden 20 μ L del regulador Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, y se incuban las células a 95 °C durante 5 minutos.
- 10 17. Se centrifuga el residuo celular durante 20 minutos a 20,000 rpm.
18. Se recoge el sobrenadante y se lo usa como plantilla para RCP usando sensibilizador F y sensibilizador R biotinilado (pedido por el cliente del sensibilizador inverso a IDT, con la siguiente secuencia: 5'-biotina-GGC TTC TGG ACTA CC TAT GC-3') (SEQ ID NO: 2), y se efectúa la separación de filamentos sobre perlas magnéticas de estreptavidina.
- 15
- 20 Cuando se completan los pasos 1 a 18 anteriores, se completa una sola ronda. Se considera que el sobrenadante de 18 es el combinado de aptámero de la ronda 1 (R1) y se usa directamente, o se amplifica usando técnicas conocidas de RCP. Para la ronda 2 (R2) se usa el combinado de aptámero R1 en lugar del banco de ADN simple en el paso 7, sobre una nueva muestra de células sin clasificar, que se preparan de acuerdo con los pasos 1 a 6. Se utiliza entonces directamente el sobrenadante o el combinado de aptámero de la ronda 2 (R2) del paso 18 de
- 25

cuando se completa la ronda 2, o se lo amplifica usando técnicas conocidas de RCP y se añade en lugar del banco de ADN del paso 7, sobre una nueva muestra de células sin clasificar en la ronda 3 (R3). Se usa entonces el sobrenadante del paso 18 de la ronda 3 del combinado de aptámero de ronda 3 (R3) en el paso 7 de la ronda 4 descrita más abajo.

Rondas 4 a 11 (Selecciones positiva y negativa con células clasificadas)

10 Preparación de las células:

Se descongelan alícuotas de espermatozoides (células que contienen X clasificado o Y clasificado) colocando la pajilla en agua a 37 °C durante un minuto, y luego se mantienen las células a la temperatura ambiente (20 a 25 °C).

1. Tomar 1 pajilla de X clasificada y 1 pajilla de células Y clasificadas;
2. Añadir a cada tubo 200 µL de regulador nuevo de PVA-semen, y centrifugar durante 12 minutos a 300 x g a 17 °C; retirar el sobrenadante, dejando alrededor de 10 µL; añadir 200 µL de regulador nuevo de PVA-semen y transferir todo a la ampolla de 200 µL de RCP.
3. Centrifugar las células durante 12 minutos a 300 x g, a 17 °C; en una ampolla de RCP de 0.2 mL (las ampollas menores mejoran la recuperación de células) y retirar el regulador, dejando aproximadamente 20 µL.
4. Añadir a cada tubo 60 µL de regulador nuevo de PVA-

semen y dividir a dos tubos por 30 μ L.

5. Contar las células usando un quimiocitómetro. Deben ser alrededor de 2×10^5 células / mL (4×10^4 células por 20 μ L).
- 5 6. Alrededor de 1 a 2 minutos antes de la adición del combinado de Aptámero R3 (ver el paso 18 de la ronda 3 anterior) a la suspensión de células, añadir el sensibilizador F a la concentración final de 50 μ M (añadir 1 μ L de 1 mM a 20 μ L de células).
- 10 7. Para la selección negativa, efectuar las siguientes mezclas
 - A. Células Y con 50 μ M de F4 y 5 nM de combinado Apt X procedente de la ronda de selección previa (o combinado de aptámero R3 únicamente, si es la
 - 15 cuarta ronda de selección).
 - B. Células X con 50 μ M de F4 y 5 nM de combinado Apt Y procedente de la ronda de selección previa (o combinado de aptámero R3 únicamente si es la cuarta
 - 20 ronda de selección). Incubar las mezclas a la temperatura ambiente durante una hora y centrifugar las células (300 x g, 17 °C, 12 minutos). Tomar el sobrenadante y usarlo en la selección positiva. Añadir a cada una de las alícuotas de células X e Y sensibilizador F para una concentración final de 50
 - 25 μ M e igual cantidad del sobrenadante procedente del paso previo.
 - C. Añadir a las células X sobrenadante procedente de la fracción 1, para obtener 2.5 nM de combinado de aptámero X y 50 μ M de F4.

D. Añadir a las células Y sobrenadante procedente de la fracción 2, para obtener 2.5 nM de combinado de aptámero Y y 50 μ M de F4.

- 5 8. Incubar las mezclas a la temperatura ambiente durante una hora.
9. Añadir 200 μ L de regulador nuevo de PVA-semen y centrifugar durante 12 minutos a 300 x g, a 17 °C.
- 10 10. Eliminar el sobrenadante y volver a disolver la pella en 200 μ L adicionales del regulador de PVA-semen.
11. Centrifugar durante 12 minutos a 300 x g, a 17 °C.
12. Eliminar el sobrenadante y volver a disolver la pella en 200 μ L adicionales del regulador de PVA-semen.
- 15 13. Centrifugar durante 12 minutos a 300 x g, a 17 °C.
14. Eliminar el sobrenadante y añadir 20 μ L del regulador e incubar las células a 95 °C durante 5 minutos.
- 20 15. Centrifugar los residuos celulares durante 20 minutos a 20,000 rpm.
16. Recoger el sobrenadante o combinado de aptámeros y usarlo como plantilla para RCP y separación de filamentos, sobre perlas magnéticas de estreptavidina.
- 25

Una ronda de la selección de aptámero, de las rondas 4 a 9 y las rondas subsiguientes, incluye los pasos 1 a 16 directamente anteriores. Luego se añade el

combinado de aptámeros de la ronda 4 al paso 7 de la siguiente ronda, la ronda 5; luego se añade el combinado de aptámero de la ronda 5 al paso 7 de la siguiente ronda, la ronda 6; luego se añade el combinado de aptámeros de la
5 ronda 6, al paso 7 de la siguiente ronda, la ronda 7; luego se añade el combinado de aptámeros de la ronda 7 al paso 7 de la siguiente ronda, la ronda 8; luego se añade el combinado de aptámeros de la ronda 8 al paso 7 de la siguiente ronda, la ronda 9; luego se añade el combinado de
10 aptámeros de la ronda 9 al paso 7 de la siguiente ronda, y continúan repitiéndose cualquier número de rondas adicionales de acuerdo con lo anterior.

La meta de esas rondas de selección de aptámeros es obtener un combinado de aptámeros que se unan
15 específicamente a células de esperma Y o X. Por lo tanto, se debe efectuar por lo menos la ronda 7 del método de selección para obtener aptámeros que se unan específicamente a la molécula de blanco o destino; más preferible, por lo menos se debe operar la ronda 8 y, muy
20 preferible, por lo menos la ronda 9 o subsiguientes, para obtener un combinado de aptámeros que sean específicos para esperma que contiene Y y esperma que contiene X.

Los inventores admiten que se puede utilizar el método anterior para preparar aptámeros específicos para el
25 blanco o destino, de cualquier tipo, siempre y cuando el combinado de células que contienen la molécula de blanco o destino, que identifica la célula (sin clasificar o clasificada) sea reemplazada en las rondas de selección de aptámero por las células de esperma Y y de esperma X, tanto

sin clasificar como clasificadas.

**ANÁLISIS CITOMÉTRICO DE CÉLULAS PARA APTÁMEROS PRODUCIDOS
EN EL MÉTODO DE SELECCIÓN DE APTÁMEROS**

Se llevó a cabo el siguiente método para proveer
5 combinados marcados de ADN y proveer una cantidad
suficiente de ADN para análisis, que pudiera ahorrar tiempo
y costos, adicionalmente, en la preparación. La técnica
conocida, RCP asimétrico, dio por resultado la producción
de uno de los filamentos de ADN. A fin de determinar si un
10 combinado de aptámeros era buen aglutinador, se mezclaron
los aptámeros marcados resultantes de la técnica de RCP
asimétrica con células de espermatozoos y se sometieron a
análisis citométrico de células. Se usó como control un
banco de ADN simple.

15 Se prepara la siguiente mezcla que contiene: 1 μ M
de Alexa 647 (obtenida de IDT como sensibilizador hecho a
la medida), sensibilizador de dirección normal marcado (5'-
Alexa 647-CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG-3') (SEQ ID NO: 1), 50
nM de sensibilizador de dirección inversa (5'-GGC TTC TGG
20 ACTA CC TAT GC-3') (SEQ ID NO: 2), 50 mM de KCl, 10 mM de
Tris-HCl (pH 8.6), 2.5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada uno de
trifosfato de desoxirribonucleótido (dNTP) y 0.05 unidad
/ μ L de Taq ADN-polimerasa.

Se efectuaron 20 ciclos de RCP, que incluyeron un
25 ciclo de RCP que consistió de fundir a 94 °C, durante 10
segundos; fijar a 56 °C durante 10 segundos, y extensión a
72 °C durante 10 segundos. El primer ciclo tuvo un paso de
fusión extendida de 30 segundos. Como plantilla se usaron
aptámeros de un solo filamento, purificados, después de

cada ronda de selección. Después que se completó el RCP se purificaron los productos usando un corte de 30 kDA de columna de purificación de ADN (Microcon Ultracel YM-30, de Millipore, Bedford, MA, E. U. A.), usando el procedimiento estándar descrito en el manual y conocido por las personas con experiencia en la materia.

Preparación de las células: Se descongela la alícuota de esperma colocando la pajilla en agua a 37 °C durante un minuto, y luego se mantienen las células a la temperatura ambiente (20-25 °C).

Se toma una o más pajillas de células sin clasificar (alrededor de 0.5 mL y 10^7 células).

1. Añadir 1 mL de regulador de PVA-semen.
2. Centrifugar las células durante 12 minutos a 300 x g, a 17 °C, en una ampolla de 1.5 mL.
3. Eliminar el regulador y volver a suspender las células en 1 mL de regulador PVA nuevo.
4. Centrifugar las células durante 12 minutos a 300 x g, a 17 °C, en una ampolla de 1.5 mL.
5. Volver a suspender las células en 300 µL de nuevo regulador de semen que contiene PVA, y contar las células usando un hemocitómetro.
6. Diluir las células a alrededor de 2×10^6 células/mL (20,000 a 40,000 células por 20 µL); y
7. Combinar 200 µL de células + 10 µL de sensibilizador F4 1 mM; luego formar alícuotas de 20 µL cada una.

Paralelamente con lo anterior:

1. Tomar una o más pajillas de células X

111

- clasificadas y una o más pajillas de células Y clasificadas.
- 5 2. Centrifugar durante 12 minutos a 300 x g, a 17 °C; retirar el sobrenadante, dejando aproximadamente 10 µL, añadir 200 µL de regulador de PVA-semen nuevo y transferir todo a la ampolla de 200 µL para RCP.
- 10 3. Centrifugar las células durante 12 minutos a 300 x g, a 17 °C, en una ampolla de 0.2 mL para RCP (las ampollas menores mejoran la recuperación de células) y eliminar el regulador, dejando alrededor de 20 µL.
- 15 4. Añadir entonces a cada tubo 200 µL de regulador de PVA-semen nuevo.
5. Contar las células usando un hemocitómetro; deben ser alrededor de 2×10^6 células por mL (4×10^4 células por 20 µL).
- 20 6. Mezclar la mezcla de células X con 1 mM de sensibilizador F para una concentración final de 50 µM y formar tantas alícuotas de 20 µL como sean necesarias para el análisis.
- 25 7. Mezclar la mezcla de células Y con 1 mM de regulador F, para una concentración final de 50 µM y formar tantas alícuotas de 20 µL como sean necesarias para el análisis.
8. Mezclar células sin clasificar con 1 mM de regulador F para una concentración final de 50 µM y formar tantas alícuotas de 20 µL como sean necesarias para el análisis.

- 25

La figura 1 provee el análisis de los aptámeros obtenidos mediante el presente método, en los cuales se

llevaron a cabo nueve rondas de selección y análisis de aptámeros, utilizando citometría en flujo. Cada población de espermatozoides vivos estaba representada por 8,000 a 9,000 células. Se diferenció la población de células vivas de las células muertas por medio de yoduro de propidio, un tinte para células muertas.

Por comparación de la unión de células X clasificadas con el banco simple y con el combinado de aptámero X (figura 1, trazos C y D, respectivamente), los resultados muestran que el combinado de aptámero X tiene alrededor de 10 veces mayor afinidad para las células X que el banco simple. Este dato muestra que se obtuvieron aptámeros específicos para células de esperma a partir del banco, durante el proceso de selección. Entonces, la comparación de las afinidades de unión del combinado de aptámeros X hacia las células clasificadas X e Y (figura 1, trazos D y B, respectivamente), indica que la afinidad del aptámero hacia las células X es alrededor de 20 veces mayor que hacia las células Y. Todos los datos anteriores, junto con el hecho de que la afinidad de las células Y al banco de ADN simple y al combinado de aptámeros X (figura 1, trazos A y B, respectivamente) es relativamente similar, comprueba que el método de la presente produce aptámeros específicos para las células X, que pueden unirse específicamente a las células X y no tiene afinidad, o la tiene muy insignificante, hacia las células Y.

Con respecto a la unión de las células Y al banco de ADN simple y al combinado de aptámeros Y, los datos (no mostrados) muestran que las células Y se unen mejor al

combinado de aptámeros Y que al banco de ADN simple, lo que es indicativo de aptámeros específicos para Y.

Después de las seis rondas de selección, se llevó a cabo el experimento de unión, y el combinado X de aptámeros mostró gran afinidad de unión hacia las células X y débil, o ninguna afinidad de unión, hacia las células Y (figura 2A). El combinado Y de aptámeros mostró afinidad de unión tanto para las células X cuanto para las Y (figura 2B). Se observó la unión usando ADN marcado de manera fluorescente y microscopia confocal de fluorescencia. Se midió la señal usando células no motiles.

Por lo general el método de la presente provee aptámeros que se unen a moléculas de blanco o destino que pueden estar o no sobre la superficie de una célula, pero que deben ser accesibles desde la superficie de una célula, tal como, de preferencia, células de esperma X o Y. El análisis citométrico de células descrito aquí provee un método para determinar si un combinado de aptámeros, obtenido en el último paso de una ronda de selección de aptámero de una sola ronda, como se describe aquí, contiene uno o más aptámeros que se unan a una molécula de blanco o destino. Se debe revisar los datos y comparar la unión del combinado de aptámero con una muestra que contiene la molécula de blanco. Estos datos de unión deben ser comparados con cualquier unión del mismo combinado de aptámero al banco de ADN natural, de preferencia el banco del que se obtuvo primeramente los combinados de aptámero, como control negativo. Adicionalmente, el combinado de aptámeros que se une también debe ser comparado con una

segunda o tercera muestra que no contenga la molécula de blanco o destino. Los resultados que muestran mejor unión del combinado de aptámeros a la molécula de blanco o destino, en comparación con la unión al banco de ADN natural se consideran como una unión preferente positiva. Adicionalmente, otras rondas de selección que se describen aquí pueden incrementar la afinidad de unión del combinado de aptámeros. Adicionalmente, si se desea separar dos poblaciones de células, con base en la unión específica a una célula y no a la otra, tal como con la separación de células de esperma X e Y, entonces, además de comparar la unión del combinado de aptámero al banco de ADN natural, también se debe analizar la unión del combinado de aptámero en cuanto a su unión a la molécula de blanco o destino preferida, así como una muestra que contenga la molécula "que no es de blanco o destino", de la que se desea separar la molécula de blanco o destino. En este último caso se deben analizar todas las comparaciones para seleccionar los combinados de aptámeros que se unan a una molécula de blanco o destino específica y que no se una o se una en menor grado o menos preferentemente a la célula o molécula de la que se desea separar la molécula de blanco o destino. De esa manera, el uso de los aptámeros para separar poblaciones de células de esperma diferentes requiere de análisis y comparación con diferentes controles y con controles negativos.

La tabla 1 provee aptámeros obtenidos a partir del combinado de aptámeros después de la ronda 9, de acuerdo con el procedimiento provisto más arriba, que se

unen preferentemente a las células de esperma X y que no se unen, o que se unen menos preferentemente a las células de esperma Y, que a las células de esperma X. Los aptámeros de la tabla 1 (SEQ ID NO: 3-35) muestran porciones de los

5 nucleótidos del extremo 5' y del extremo 3' de cada secuencia, que están subrayados. Esas porciones representan las regiones constantes de los aptámeros que corresponden al sensibilizador de dirección positiva CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG (SEQ ID NO: 1) en el extremo 5', y

10 el sensibilizador de dirección inversa GGC TTC TGG ACTA CC TAT GC (SEQ ID NO: 2) en el extremo 3', usado para generar los aptámeros a partir del banco natural NP40. Cada una de esas regiones constantes tiene una longitud de 20

15 nucleótidos. Se pretende que los aptámeros de la presente invención comprendan la secuencia de longitud de nucleótidos de cada una de las SEQ ID NO: 3-35, o una porción de ellas. En otra modalidad, el aptámero de la presente invención comprende los nucleótidos 21-60 de las SEQ ID NO: 3-10 y 12-35, o porciones de ellos, o los

20 nucleótidos 21-43 de SEQ ID NO: 11, o porciones de ellos. Un aptámero (SEQ ID NO: 3-35) o una porción de la secuencia mencionada, que se debe considerar que es un aptámero dentro del significado de la presente invención, se debe unir de preferencia a una molécula de blanco o destino o a

25 una célula de esperma X o Y, con una afinidad mayor que cualquier célula contaminante o de control.

Las secuencias de ADN de la tabla 1 representan secuencias seleccionadas que fueron localizadas en el combinado de aptámeros de la ronda 9. Varias de las

secuencias estaban presentes en el combinado de aptámeros en varias copias.

TABLA 1

- 5 SEQ ID NO : 3
CTCCTCTGACTGTAACCACGCACCGAATACAGACTGTAAAGACAGAAAGTTCATAAACG
TGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
SEQ ID NO: 4
CTCCTCTGACTGTAACCACGTACGCTATTATTATTCAATAACGATAAGACTTATAATAT
- 10 AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
SEQ ID NO: 5
CTCCTCTGACTGTAACCACGTATAATCATCGGGGTAAGTTGAGGCATTAT
CTACGCCATAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
SEQ ID NO: 6
- 15 CTCCTCTGACTGTAACCACGATACCAATACGTAAATTCTATAAGGCATA
CATATTATAACAAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
SEQ ID NO: 7
CTCCTCTGACTGTAACCACGTCTGGAACATGATGCAGGTGTCTAACAGTATGAATACTT
GGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
- 20 SEQ ID NO: 8
CTCCTCTGACTGTAACCACGCTGTGCGACTACAGATCACTACTTTCGCTAAGGTACCTCA
AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
SEQ ID NO: 9
CTCCTCTGACTGTAACCACGTATAACGTTTTTCATCTATTTGTTTACTTAATACCTAAT
- 25 AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
SEQ ID NO: 10
CTCCTCTGACTGTAACCACGATTGTATTAGTTAACGATACTTATTATTTGTAAGTTATT
AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
SEQ ID NO : 11

CTCCTCTGACTGTAACCACGAATAACATTACATATAGTTACTTGCATAGGTAGTCCAGA
AGCC

SEQ ID NO: 12

CTCCTCTGACTGTAACCACGGTAAACATGATAATAATACTTCTCCTTTTGTAATGGATT

5 TGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 13

CTCCTCTGACTGTAACCACGGGTACATATATCCCTATTAATTGACACATATATTTACTT
AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 14

10 CTCCTCTGACTGTAACCACGCATCATTTTCGCTAATAGATAAAGTGTTTCGTCGTCAGAGC
AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 15

CTCCTCTGACTGTAACCACGATACATTTACGTAAATTCTATTAACATTTATATTCTACA
TGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

15 SEQ ID NO: 16

CTCCTCTGACTGTAACCACGTAATATTAACTTTAAACTCCAATACTGTTATTTATCAAG
TGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 17

CTCCTCTGACTGTAACCACGGTATATCGACTTATTACAATGATAAGTATTATTAACTT

20 AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 18

CTCCTCTGACTGTAACCACGAAACATTACATGGAAC TTGATCGTTTAGGATAATAAATG
CGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 19

25 CTCCTCTGACTGTAACCACGTGTACCACTTTCTGTTACGCTAATGGCACACTACACTTA
AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 20

CTCCTCTGACTGTAACCACGTAAC TTGGAATAATACTTCTTGTAATTTTGCATAGGTA
GTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 21

CTCCTCTGACTGTAACCACGTAAATATATGAGTTATTTATGAGTTCATTGAATTCTACT
TGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 22

5 CTCCTCTGACTGTAACCACGGACTCAGCCTGATCTACCTTCAAAGGCCACTAGGCCTTG
AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NC: 23

CTCCTCTGACTGTAACCACGTATACTTACTTTACTAAACTACTACTAAGTAAGTAAAC
AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

10 SEQ I O NO : 24

CTCCTCTGACTGTAACCACGTATCACTTACATTTAAATCAATGTATATCAATATTTTAG
TGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO : 25

CTCCTCTGACTGTAACCACGTCAGGATAATGATCATAAGATATCTTTATGTATATACTA
TGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

15 SEQ ID NO: 26

CTCCTCTGACTGTAACCACGCCAGTTCGTCATCAGATTCCATCTTTAGCTACTTACAAC
TGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 27

20 CTCCTCTGACTGTAACCACGCAAAAGTCACTGGCCGTTGAGTTATATGAGTAGGGAGA
GGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 28

CTCCTCTGACTGTAACCACGCCAGACCGGATCCCTGATGTATTTATTTTCGGAAGGTTG
AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

25 SEQ ID NO: 29

CTCCTCTGACTGTAACCACGTAATGAGTGACGAAAGTGTGAGATGGAGCCTTCTACCTG
TGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 30

CTCCTCTGACTGTAACCACGCGATTAAAACCGGCAGTTATCTCTTAGCAAGCCTGATCC

TGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 31

CTCCTCTGACTGTAACCACGGGTTCAATGTAAGGGTTGGTGTGGTTGGACTAGCGCTCA

GTGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

5 SEQ ID NO: 32

CTCCTCTGACTGTAACCACGGCATATGTGACCATCGAATAGCTGGCGACGAACCAGATT

CGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 33

CTCCTCTGACTGTAACCACGACGACAGTCATCCCTGACTCGGATCTTACATGTCGTTAC

10 AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 34

CTCCTCTGACTGTAACCACGTTAAATCTTATAGGATTCTAGTGTACAAATATATAACTT

AGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

SEQ ID NO: 35

15 CTCCTCTGACTGTAACCACGCAAAAGTCACTGGCCGTTTCGAGTTATATGAGTAGGGAGA

GGCATAGGTAGTCCAGAAGAT

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por quienes tengan experiencia ordinaria en la materia a la que pertenece la presente invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y demás referencias mencionadas aquí quedan incorporadas en su totalidad como referencia. El uso de las palabras "un" o "una" en la presente, para describir algún aspecto de la presente invención, se debe considerar indicando singular o plural.

Si bien se ha descrito la presente invención en relación con ciertas modalidades preferidas de ella, y se han señalado muchos detalles con fines ilustrativos, será

aparente para quienes tengan experiencia en la materia que la invención es susceptible de modalidades adicionales y que se pueden variar ciertos detalles de los descritos aquí, en forma considerable, sin salirse de los principios

5 básicos de la invención.

REIVINDICACIONES

1.- Una secuencia aislada de ácido nucleico que no ocurre en la naturaleza, que se une a una molécula de blanco o destino en una célula de esperma de mamífero, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de:

- 5 (a) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 3-35, o una porción de ella que se une a una molécula de blanco o destino;
- 10 (b) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homogénea con y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la molécula de blanco o destino en la célula de esperma, que la secuencia de
- 15 nucleótidos de (a) o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino; y
- (c) una secuencia de nucleótidos que tiene sustancialmente la misma estructura y que tiene sustancialmente la misma capacidad para unirse a la
- 20 molécula de blanco o destino en la célula de esperma, que la secuencia de nucleótidos de (a) o (b), o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino.

2.- La secuencia aislada de ácido nucleico que no ocurre en la naturaleza de conformidad con la reivindicación 1, en la que está omitida por lo menos una porción de los nucleótidos 1-20 de las SEQ ID NO: 3-35, o una porción de ellas que se une a la molécula de blanco o destino.

3.- La secuencia aislada de ácido nucleico que no ocurre en la naturaleza de conformidad con la reivindicación 1, en la que está omitida por lo menos una porción de los nucleótidos 61-80 de las SEQ ID NO: 3-10 y
5 12-35, o los nucleótidos 44-63 de SEQ ID NO: 11, o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino.

4.- La secuencia aislada de ácido nucleico que no ocurre en la naturaleza de conformidad con la
10 reivindicación 1, en la que está omitida por lo menos una porción de los nucleótidos 1-20 de las SEQ ID NO: 3-35 y/o en la que está omitida por lo menos una porción de los nucleótidos 61-80 de las SEQ ID NO: 3-10 o 12-35, o los nucleótidos 44-63 de SEQ ID NO: 11, o una porción de ella
15 que se une a la molécula de blanco o destino.

5.- La secuencia aislada de ácido nucleico que no ocurre en la naturaleza de conformidad con la reivindicación 1, en la que las secuencias de ADN comprenden los nucleótidos 21-60 de SEQ ID NO: 3-10 o 12-35
20 o los nucleótidos 21-43 de SEQ ID NO: 11, o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino.

6.- Una composición que comprende por lo menos una de las secuencias de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de:

- 25 (a) una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1;
- (b) una secuencia de ácido nucleico de (a), en la que está omitida por lo menos una porción de los nucleótidos 1-20 de dichas SEQ ID NO: 3-35, o una

porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino;

5 (c) una secuencia de ácido nucleico de (a), en la que está omitida por lo menos una porción de los nucleótidos 61-80 de las SEQ ID NO: 3-10 y 12-35 o los nucleótidos 44-63 de SEQ ID NO: 11, o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino;

10 (d) una secuencia de ácido nucleico de (a), en la que está omitida por lo menos una porción de los nucleótidos 1-20 de SEQ ID NO: 3-35 y/o donde está omitida por lo menos una porción de los nucleótidos 61-80 de las SEQ ID NO: 3-10 o 12-35 o los nucleótidos 44-63 de SEQ ID NO: 11, o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino; y

15 (e) una secuencia de ácido nucleico de (a), donde las secuencias de ADN comprenden los nucleótidos 21-60 de SEQ ID NO: 3-10 o 12-35 o los nucleótidos 21-43 de SEQ ID NO: 11, o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino.

20 7.- Un método para separar una mezcla de células de esperma de mamífero que contiene por lo menos una molécula de blanco o destino, que comprende:

25 poner en contacto las células de esperma de mamífero con la composición de la reivindicación 6, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión de la secuencia de ácido nucleico a las células de esperma; y

separar las células de esperma a dos o más poblaciones de células de esperma, con base en la capacidad de por lo menos una secuencia de ácido nucleico para unirse a una

125

molécula de blanco o destino en una célula de esperma.

8.- El método de conformidad con la reivindicación 7, que comprende adicionalmente separar las dos o más poblaciones de células de esperma unidas a la
5 secuencia de ácido nucleico desde la secuencia de ácido nucleico, y recuperar las células de esperma separadas.

9.- El método de conformidad con la reivindicación 8, en el que la secuencia de ácido nucleico se une preferentemente a las células de esperma X, y se
10 recupera una población predominantemente de células de esperma X.

10.- El método de conformidad con la reivindicación 8, en el que la secuencia de ácido nucleico se une preferentemente a las células de esperma Y, y se
15 recupera una población predominantemente de células de esperma Y.

11.- El método de conformidad con la reivindicación 7, en el que las células de esperma de mamífero son células de esperma de ganado vacuno o células
20 de esperma humano.

12.- El método de conformidad con la reivindicación 7, en el que por lo menos una de las poblaciones de células de esperma comprende células de esperma Y o células de esperma X.

25 13.- El método de conformidad con la reivindicación 8, en el que por lo menos una de las poblaciones de células de esperma comprende células de esperma no unidas a la secuencia de ácido nucleico.

14.- El método de conformidad con la

reivindicación 8, en el que por lo menos una de las poblaciones de células de esperma comprende células de esperma unidas a la secuencia de ácido nucleico.

5 15.- El método de conformidad con la reivindicación 7, en el que la composición comprende dos o más secuencias diferentes de ácido nucleico.

16.- El método de conformidad con la reivindicación 7, en el que la secuencia de ácido nucleico se une a una perla no magnética o a una perla magnética.

10 17.- Un método para producir por lo menos una secuencia de ácido nucleico que se une a una molécula de blanco o destino en la superficie de una célula de esperma de mamífero, que comprende los pasos de:

15 (a) poner en contacto una colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con la molécula de blanco o destino, bajo condiciones favorables para la unión entre por lo menos una de dichas moléculas de ácido nucleico y la molécula de blanco o destino, para formar por lo menos un complejo que comprende la al

20 menos una molécula de ácido nucleico unida a una molécula de blanco o destino; donde cada una de las moléculas de ácido nucleico comprende por lo menos un segmento de secuencias de nucleótidos aleatorizadas;

25 (b) separar los complejos de las moléculas no unidas de ácido nucleico y las moléculas de blanco o destino no unidas; y

(c) recuperar las moléculas unidas de ácido nucleico del complejo separado; donde las moléculas de ácido nucleico unidas comprenden por lo menos una secuencia

de ácido nucleico que se une a la molécula de blanco o destino;

donde se selecciona por lo menos una secuencia de ácido nucleico del grupo que consiste de:

- 5 (a) una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1;
- (b) una secuencia de ácido nucleico de (a), en la que está omitida por lo menos una porción de los nucleótidos 1-20 de las SEQ ID NO: 3-35, o una porción
- 10 de ella que se une a la molécula de blanco o destino;
- (c) una secuencia de ácido nucleico de (a), en la que está omitida por lo menos una porción de los nucleótidos 61-80 de las SEQ ID NO: 3-10 y 12-35 o los nucleótidos 44-63 de SEQ ID NO: 11, o una porción de
- 15 ella que se une a la molécula de blanco o destino;
- (d) una secuencia de ácido nucleico de (a), en la que está omitida por lo menos una porción de los nucleótidos 1-20 de las SEQ ID NO: 3-35 y/o en la que está omitida por lo menos una porción de los
- 20 nucleótidos 61-80 de las SEQ ID NO: 3-10 o 12-35, o los nucleótidos 44-63 de la SEQ ID NO: 11, o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino;
- y
- (e) una secuencia de ácido nucleico de (a), en la que
- 25 las secuencias de ADN comprenden los nucleótidos 21-60 de las SEQ ID NO: 3-10 o 12-35, o los nucleótidos 21-43 de SEQ ID NO: 11, o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino.

18.- El método de conformidad con la

reivindicación 17, que comprende adicionalmente el paso de amplificar la molécula de ácido nucleico recuperada para crear más moléculas de ácido nucleico.

5 19.- El método de conformidad con la reivindicación 17, en el que el paso de poner en contacto comprende incubar las moléculas para formar una mezcla de equilibrio; y en el que el paso de separación comprende electroforesis de capilaridad.

10 20.- El método de conformidad con la reivindicación 17, en el que se selecciona la molécula de blanco o destino del grupo que consiste de una proteína, un péptido, una enzima, un lípido, un glicolípido, un fosfolípido, una glicoproteína, un carbohidrato, una molécula pequeña o una molécula de la superficie de la
15 célula.

21.- El método de conformidad con la reivindicación 20, en el que la molécula de blanco o destino es una molécula de blanco o destino contenida en una célula de esperma.

20 22.- El método de conformidad con la reivindicación 21, en el que la molécula de blanco o destino distingue por lo menos una célula de esperma X de por lo menos una célula de esperma Y.

25 23.- El método de conformidad con la reivindicación 21, en el que las células de esperma son células de esperma de ganado vacuno o células de esperma humano.

24.- El método de conformidad con la reivindicación 17, en el que las secuencias de ácido

nucleico del paso (c) son usadas subsiguientemente como una colección de diferentes moléculas de ácido nucleico en el paso (a).

5 25.- El método de conformidad con la
reivindicación 17, en el que se repiten los pasos (a), (b)
y (c) una o más veces, dos o más veces, tres o más veces,
cuatro o más veces, cinco o más veces, seis o más veces,
siete o más veces u ocho o más veces, para producir una
10 secuencia de ácido nucleico preferente para las células de
esperma Y o para las células de esperma X.

26.- El método de conformidad con la
reivindicación 17, que comprende adicionalmente incubar la
colección de diferentes moléculas de ácido nucleico y la
molécula de blanco o destino, con un sensibilizador que es
15 sustancialmente complementario de la secuencia de ácido
nucleico de plantilla.

27.- El método de conformidad con la
reivindicación 26, en la que la secuencia de ácido nucleico
de plantilla es una secuencia que corresponde a un segmento
20 de la secuencia de ácido nucleico que permanece invariable
dentro de una pluralidad de aptámeros.

28.- El método de conformidad con la
reivindicación 27, en la que la secuencia de ácido nucleico
es de un banco de ADN y la secuencia de ácido nucleico de
25 plantilla es una secuencia de vector.

29.- El método de conformidad con la
reivindicación 17, en el que el paso (a) comprende
adicionalmente un paso de selección negativa, seguido de un
paso de selección positiva.

30.- El método de conformidad con la reivindicación 17, en el que se purifica la secuencia de ácido nucleico recuperada.

5 31.- El método de conformidad con la reivindicación 17, en el que se cuantifica una pluralidad de la secuencia de ácido nucleico recuperada, usando citometría en flujo.

10 32.- El método de conformidad con la reivindicación 22, en el que la secuencia de ácido nucleico permite la separación de células de esperma Y de las células de esperma X; donde el método produce un primer grupo de secuencias de ácido nucleico que se une a las células de esperma Y de la primera muestra, y un segundo grupo de secuencias de ácido nucleico que se une a las
15 células de esperma X de la segunda muestra; y dicho método comprende adicionalmente:

(d) compararlos grupos primero y segundo de la secuencia de ácido nucleico para identificar, mediante un proceso de eliminación, por lo menos una secuencia
20 de ácido nucleico que se una únicamente a las células de esperma Y o bien a las células de esperma X.

33.- El método de conformidad con la reivindicación 32, en el que se producen las muestras primera y segunda de células de esperma de mamífero
25 mediante citometría en flujo y clasificación de células.

34.- El método de conformidad con la reivindicación 32, en el que se produce la secuencia de ácido nucleico mediante el proceso en el que el paso de poner en contacto (a) comprende adicionalmente:

- 5 a1) poner en contacto una primera colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con una molécula de blanco o destino, contenida en una primera muestra de células de esperma Y, bajo condiciones favorables para la unión entre las moléculas de ácido nucleico y las células de esperma Y, a fin de formar por lo menos un complejo que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico unida a por lo menos una célula de esperma Y; donde cada una de las
- 10 moléculas de ácido nucleico comprende por lo menos un segmento de secuencias de nucleótidos aleatorizadas; y
- 15 (a) poner en contacto una segunda colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con una molécula de blanco o destino contenida en una segunda muestra de células de esperma X, bajo condiciones favorables para la unión entre las moléculas de ácido nucleico y las células de esperma X, a fin de formar por lo menos un complejo que comprende por lo menos una molécula de ácido nucleico unida a por lo menos una célula de esperma X; donde cada una de las
- 20 moléculas de ácido nucleico comprende por lo menos un segmento de secuencias de nucleótidos aleatorizadas; y donde el paso de recuperación (c) produce de esa manera por lo menos una secuencia de ácido nucleico que se une a las
- 25 células de esperma Y y/o por lo menos una secuencia de ácido nucleico que se une a las células de esperma X.

35.- El método de conformidad con la reivindicación 34, en el que se recuperan las secuencias de ácido nucleico que se unen al esperma Y.

36.- El método de conformidad con la reivindicación 34, en el que se recuperan las secuencias de ácido nucleico que se unen al esperma X.

5 37.- El método de conformidad con la reivindicación 32, en el que antes del paso (a) ocurre por lo menos una ronda de contacto de las moléculas de ácido nucleico con una población de células sin clasificar, que comprende tanto células de esperma X cuanto células de esperma Y.

10 38.- El método de conformidad con la reivindicación 32, en el que el paso de separación (b) comprende adicionalmente el paso de separar las células de esperma unidas a la secuencia de ácido nucleico, de la secuencia de ácido nucleico; y el paso de recuperación (c)
15 comprende adicionalmente recuperar las células de esperma separadas.

39.- El método de conformidad con la reivindicación 32, en el que las células de esperma de mamífero son células de esperma de ganado vacuno o células
20 de esperma humano.

40.- El método de conformidad con la reivindicación 17, en el que la secuencia de ácido nucleico está unida a una perla no magnética o a una perla magnética.

25 41.- Un método para producir una secuencia de ácido nucleico que permite la separación de las células de esperma Y de las células de esperma X, que comprende los pasos de:

(a) obtener una primera muestra de células de

esperma Y y una segunda muestra de células de esperma X;

5 (b) producir un primer grupo de secuencias de ácido nucleico que se una a las células de esperma Y de la primera muestra, y un segundo grupo de secuencias de ácido nucleico que se una a las células de esperma X de la segunda muestra; y

10 (c) comparar los grupos primero y segundo de secuencias de ácido nucleico para identificar, mediante un proceso de eliminación, por lo menos una secuencia de ácido nucleico que se una únicamente ya sea a las células de esperma Y o ya sea a las células de esperma X.

15 42.- Un método para producir una secuencia de ácido nucleico que permite la separación de células de esperma X de células de esperma Y, que comprende los pasos de:

20 (a) poner en contacto una población mixta de células de esperma X y de esperma Y con una secuencia de ácido nucleico que se una preferentemente a las células de esperma X para formar complejos unidos de ácido nucleico-esperma X;

25 (b) separar las células de esperma X de la población original de células de esperma mixtas, dejando una población de células de esperma rica en contenido de Y; y

(c) soltar las células de esperma X unidas de los complejos de secuencia de ácido nucleico-esperma X; y

(d) recuperar las células de esperma X.

43.- El método de conformidad con la reivindicación 42, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de:

- 5 (a) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 3-35, o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino;
- 10 (b) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homóloga con, y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la molécula de blanco o destino de la célula de esperma, que la secuencia de nucleótidos de (a), o una porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino;
- 15 (c) una secuencia de nucleótidos que tiene sustancialmente la misma estructura y que tiene sustancialmente la misma capacidad para unirse a la molécula de blanco o destino de la célula de esperma, que la secuencia de nucleótidos de (a) o (b), o una
- 20 porción de ella que se une a la molécula de blanco o destino.

44.- El método de conformidad con la reivindicación 42, en el que se recuperan las células de esperma Y del paso (b).

- 25 45.- La población de células de esperma producida mediante el método de la reivindicación 32, o un estuche para inseminación artificial de un mamífero, que contiene la población de células de esperma que comprende células de esperma unidas al aptámero.

46.- La población de células de esperma producida mediante el método de la reivindicación 32, o un estuche para inseminación artificial de un mamífero, que contiene la población de células de esperma que comprende células de esperma no unidas al aptámero.

47.- La población de células de esperma o el equipo de conformidad con la reivindicación 45, en el que las células de esperma son células de esperma de ganado bovino.

48.- La población de células de esperma o el estuche de conformidad con la reivindicación 45, en el que las células de esperma son células de esperma humano.

49.- La población de células de esperma o el estuche de conformidad con la reivindicación 45, que comprende células de esperma X o células de esperma Y.

50.- Un método de inseminación artificial para un mamífero, que comprende administrar al mamífero la población de células de esperma que comprende células de esperma unidas a la secuencia de ácido nucleico o no unida al ácido nucleico, producida mediante el método de la reivindicación 32.

RESUMEN

La presente invención provee un aptámero o un grupo de aptámeros que se une(n) a una molécula de blanco o destino en la superficie de una célula de esperma de mamífero, y a un método para producir los aptámeros. El método comprende poner en contacto una colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con la molécula de blanco o destino, bajo condiciones favorables para la unión entre al menos una de las moléculas de ácido nucleico y la molécula de blanco o destino, para formar por lo menos un complejo que comprende la unión de la molécula de ácido nucleico a la molécula de blanco o destino; donde cada una de las moléculas de ácido nucleico comprende por lo menos un segmento de secuencias de nucleótido seleccionadas al azar. Se separan luego los complejos de las moléculas de ácido nucleico sin unir y las moléculas de blanco o destino sin unir; y se recupera la molécula de ácido nucleico unida, del complejo separado. Se usan los aptámeros para separar células de esperma con base en las calidades de las células de esperma, por ejemplo, si las células contienen cromosomas X o cromosomas Y.

137

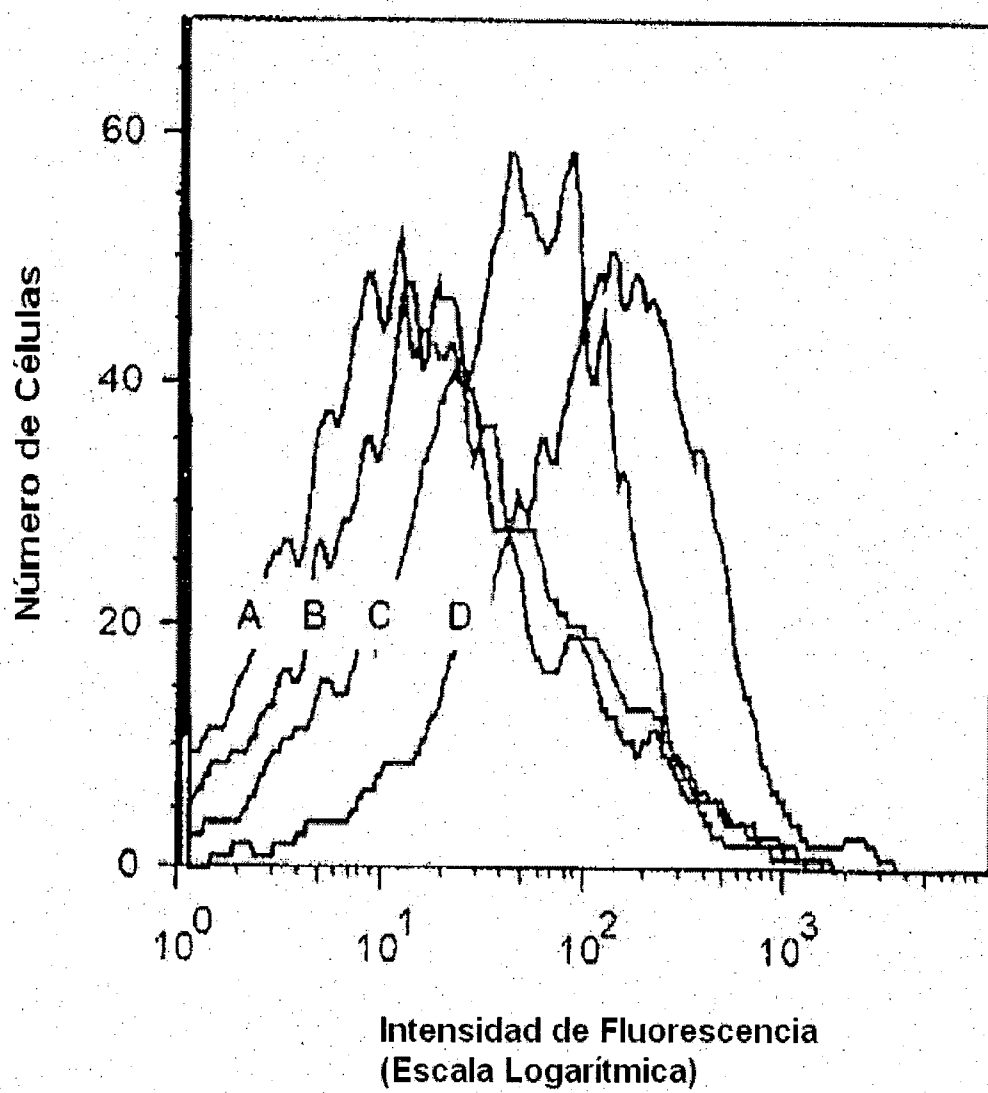


FIGURA 1

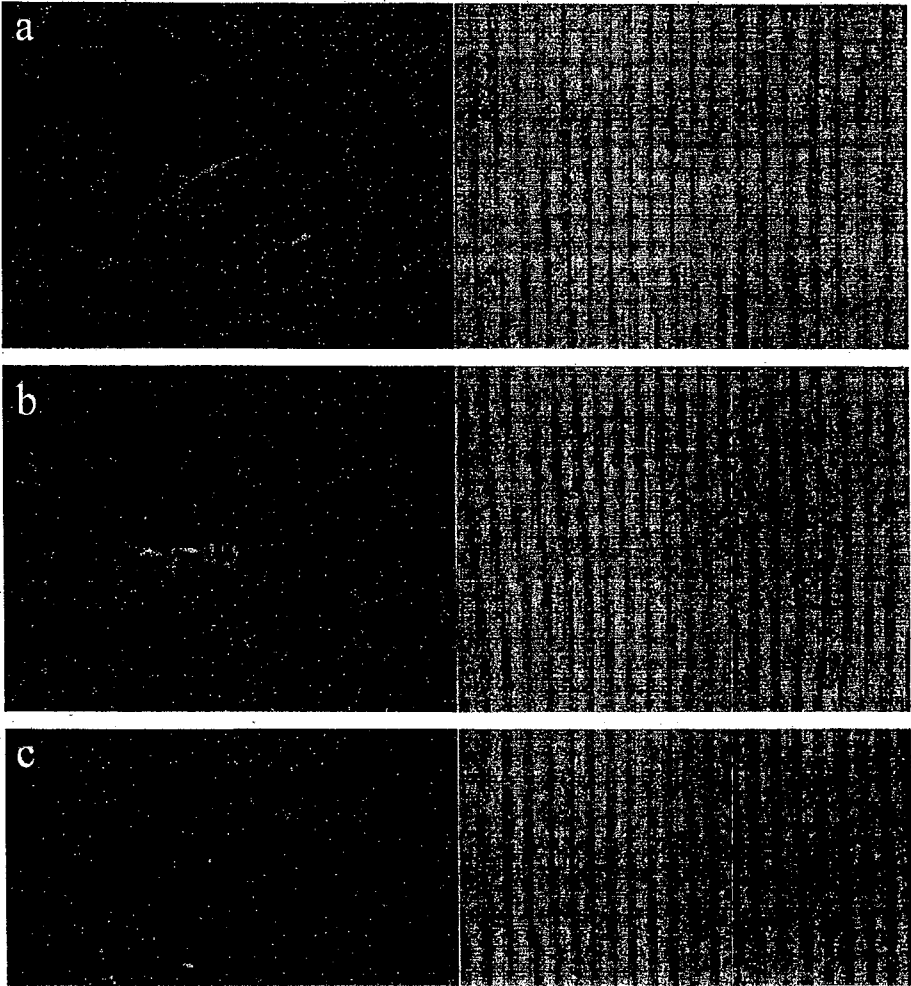


FIGURA 2 A

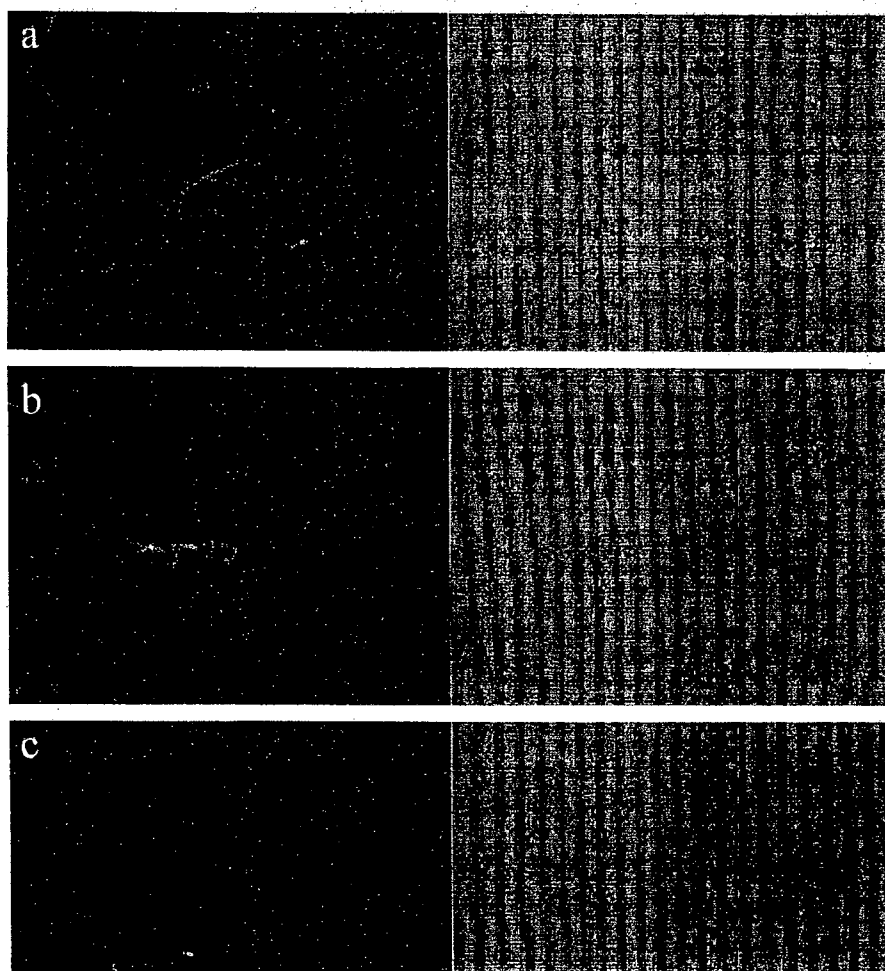


FIGURA 2B

140

BICE 003 01WO SeqList ST25 (2)
SEQUENCE LISTING

<110> Biocern, Inc.

<120> SPERM CELL SEPARATION METHODS AND COMPOSITIONS CONTAINING
APTAMERS FOR USE THEREIN

<130> BICE-003/01WO

<150> US 60/824,069

<151> 2006-08-30

<160> 35

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be ALEXA 647 fluorescently labeled

<400> 1

ctctctgac tgtaaccacg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> May be biotinylated

<400> 2

ggcttctgga ctacctatgc

20

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)

<210> 3
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Aptamer

<400> 3
 ctctctgac tgytaaccacg caccgaatac agactgtaaa gacagaaagt tcatnaacgt 60
 gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 4
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Aptamer

<400> 4
 ctctctgac tgytaaccacg tacgctatta ttattcaata acgataagac ttataatata 60
 gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 5
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Aptamer

<400> 5
 ctctctgac tgytaaccacg tataatcatc ggggtaagtt gaggcattat ctacgccata 60
 gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 6
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Aptamer

<400> 6
 ctctctgac tgytaaccacg ataccaatac gtaaattcta taaggcatac atattatata 60

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)

agcataggta gtccagaagc c 81

- <210> 7
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 7
ctcctctgac tgaaccacg tctggaacat gatgcaggty tctaacagta tgaatacttg 60
gcataggtag tccagaagcc 80

- <210> 8
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 8
ctcctctgac tgaaccacg ctgtcgacta cagatcacta ctttcgctaa ggtacctcaa 60
gcataggtag tccagaagcc 80

- <210> 9
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 9
ctcctctgac tgaaccacg tataacgttt ttcactctatt tgtttactta atacctaata 60
gcataggtag tccagaagcc 80

- <210> 10
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>

143

BICE 003 01WO SeqList ST25 (2)

<223> Aptamer

<400> 10

ctcctctgac tgytaaccacg attgtattag ttaacgatac ttattatttg taagttatta 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 11

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 11

ctcctctgac tgytaaccacg aataacatta catatagtta ctgcatagg tagtccagaa 60

gcc

63

<210> 12

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 12

ctcctctgac tgytaaccacg gtaaacatga taataatact tctcctttg taatggattt 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 13

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 13

ctcctctgac tgytaaccacg ggtacatata tccctattaa ttgacacata tatttactta 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 14

<211> 80

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 14
ctcctctgac tgtaaccacg catcatttcg ctaatagata aagtgttcgt cgtcagagca 60
gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 15
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 15
ctcctctgac tgtaaccacg atacatttac gtaaattcta ttaacattta tattctacat 60
gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 16
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 16
ctcctctgac tgtaaccacg taatattaac tttaaactcc aatactgtta ttatcaagt 60
gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 17
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 17
ctcctctgac tgtaaccacg gtatatcgac ttattacaat gataagtatt attaaactta 60
gcataggtag tccagaagcc 80

145

BICE 003 01W0 SeqList_ST25 (2)

<210> 18
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 18
ctcctctgac tgaaccacg aaacattaca tggaaactga tcgttttagga taataaatgc 60
gcataggttag tccagaagcc 80

<210> 19
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 19
ctcctctgac tgaaccacg tgaaccactt tctgttacgc taatggcaca ctacacttaa 60
gcataggttag tccagaagcc 80

<210> 20
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 20
ctcctctgac tgaaccacg taacttggaa taatacttct tgaataattt gcataggttag 60
tccagaagcc 70

<210> 21
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

BICE 003 01WO SeqList ST25 (2)

<400> 21

ctcctctgac tgytaaccacg taaatatatg agttatttat gagttcattg aattctactt 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 22

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 22

ctcctctgac tgytaaccacg gagtcagcct gatctacctt caaaggccac taggccttga 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 23

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 23

ctcctctgac tgytaaccacg tatacttact ttactnaaac tactactaag taagtaaaca 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 24

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer

<400> 24

ctcctctgac tgytaaccacg tatcacttac atttaaatca atgtatatca atattttagt 60

gcataggtag tccagaagcc

80

<210> 25

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

BICE 003 01WO SeqList ST25 (2)

<220>
<223> Aptamer

<400> 25
ctcctctgac tgytaaccacg tcaggataat gatcataaga tatctttatg tatatactat 60
gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 26
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 26
ctcctctgac tgytaaccacg ccagttcgtc atcagattcc atctttagct acttacaact 60
gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 27
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 27
ctcctctgac tgytaaccacg caaaagtcac tggccgttcg agttatatga gtagggagag 60
gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 28
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Aptamer

<400> 28
ctcctctgac tgytaaccacg ccagaccgga tccctgatgt atttatttc ggaagggtga 60
gcataggtag tccagaagcc 80

BICE 003 01WO SeqList_ST25 (2)

<210> 29
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Aptamer

<400> 29
 ctctcttgac tgaaccacg taatgagtga cgaaagtgc agatggagcc ttctacctgt 60
 gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 30
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Aptamer

<400> 30
 ctctcttgac tgaaccacg cgattaaaac cggcagttat ctcttagcaa gcctgatcct 60
 gcataggtag tccagaagcc 80

<210> 31
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Aptamer

<400> 31
 ctctcttgac tgaaccacg ggttcaatgt aagggttgggt gtggttggac tagcgctcag 60
 tgcataggta gtcagaagc c 81

<210> 32
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Aptamer

<400> 32
 ctctcttgac tgaaccacg gcatatgtga gcatcgaata gctggcgacg aaccagattc 60

149

BICE 003 01WO SeqList ST25 (2)

gcataggtag tccagaagcc 80

- <210> 33
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 33
ctctctgac tynaaccacg acgacagtc tccctgactc ggatcttaca tctcggtaca 60

gcataggtag tccagaagcc 80

- <210> 34
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 34
ctctctgac tynaaccacg ttaaattctta taggattcta ggtacaaat atataactta 60

gcataggtag tccagaagcc 80

- <210> 35
- <211> 80
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Aptamer

<400> 35
ctctctgac tynaaccacg caaaagtcac tggccgttcg agttatatga gtagggagag . 60

gcataggtag tccagaagat 80

150

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION X PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante (s)

BIOCERN, INC.

(72) Inventor(es)

OKSENBERG, David A.; KRYLOV, Sergey; y MUSHEEV, Michael

(74) Apoderado:

JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

(30) Prioridad

(31)

No. Prioridad

(32)

Fecha

(33)

País

60/824,069

30/08/2006

US

(85) Fecha inicio fase nacional: **30-03-09**

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **30-08-07**

No. de solicitud **PCT/ US2007/077300**

(87)

Publicación internacional

Fecha: **06 - 03 - 08** Fecha (dd/mm/aa)

N° publicación: **WO 2008/ 028081 A2**

(54) Título:

MÉTODOS PARA SEPARACIÓN DE CÉLULAS DE ESPERMA Y COMPOSICIONES QUE CONTIENEN APTÁMEROS O SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO PARA USO EN ELLOS

151

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION X PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s) **BIOCERN, INC.**

(72) Inventor(es): **OKSENBERG, David A.; KRYLOV, Sergey; y MUSHEEV, Michael**

(74) Apoderado: **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/824,069	30/08/2006	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: **30-03-09**

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **30-08-07**

No. de solicitud **PCT/ US2007/077300**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **06 - 03 - 08**

No. Publicación: **WO 2008/ 028081 A2**

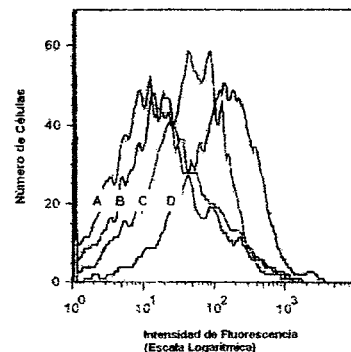


FIGURA 1

(54) Título: **MÉTODOS PARA SEPARACIÓN DE CÉLULAS DE ESPERMA Y COMPOSICIONES QUE CONTIENEN APTÁMEROS O SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO PARA USO EN ELLOS**

(57) Resumen: La presente invención provee un aptámero o un grupo de aptámeros que se une(n) a una molécula de blanco o destino en la superficie de una célula de esperma de mamífero, y a un método para producir los aptámeros. El método comprende poner en contacto una colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con la molécula de blanco o destino, bajo condiciones favorables para la unión entre al menos una de las moléculas de ácido nucleico **CONTINUA AL RESPALDO**

y la molécula de blanco o destino, para formar por lo menos un complejo que comprende la unión de la molécula de ácido nucleico a la molécula de blanco o destino; donde cada una de las moléculas de ácido nucleico comprende por lo menos un segmento de secuencias de nucleótido seleccionadas al azar. Se separan luego los complejos de las moléculas de ácido nucleico sin unir y las moléculas de blanco o destino sin unir; y se recupera la molécula de ácido nucleico unida, del complejo separado. Se usan los aptámeros para separar células de esperma con base en las calidades de las células de esperma, por ejemplo, si las células contienen cromosomas X o cromosomas Y.

152

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl:	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) BIOCERN, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 60/824,069	(32) Fecha 30/08/06	(72) Inventor(es) OKSENBERG, David A.; KRYLOV, Sergey; MUSHEEV, Michael
		(33) Pais US	(74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 30-03-09		(87) Publicación Internacional Fecha: Fecha (dd/mm/aa) 06 - 03 - 08	
Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 30-08-07 No. de solicitud PCT/ US2007/077300		N° publicación: WO 2008/ 028081 A2	
(54) Título: MÉTODOS PARA SEPARACIÓN DE CÉLULAS DE ESPERMA Y COMPOSICIONES QUE CONTIENEN APTÁMEROS O SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO PARA USO EN ELLOS			

Resumen:

La presente invención provee un aptámero o un grupo de aptámeros que se une(n) a una molécula de blanco o destino en la superficie de una célula de esperma de mamífero, y a un método para producir los aptámeros. El método comprende poner en contacto una colección de diferentes moléculas de ácido nucleico con la molécula de blanco o destino, bajo condiciones favorables para la unión entre al menos una de las moléculas de ácido nucleico y la molécula de blanco o destino, para formar por lo menos un complejo que comprende la unión de la molécula de ácido nucleico a la molécula de blanco o destino; donde cada una de las moléculas de ácido nucleico comprende por lo menos un segmento de secuencias de nucleótido seleccionadas al azar. Se separan luego los complejos de las moléculas de ácido nucleico sin unir y las moléculas de blanco o destino sin unir; y se recupera la molécula de ácido nucleico unida, del complejo separado. Se usan los aptámeros para separar células de esperma con base en las calidades de las células de esperma, por ejemplo, si las células contienen cromosomas X o cromosomas Y.

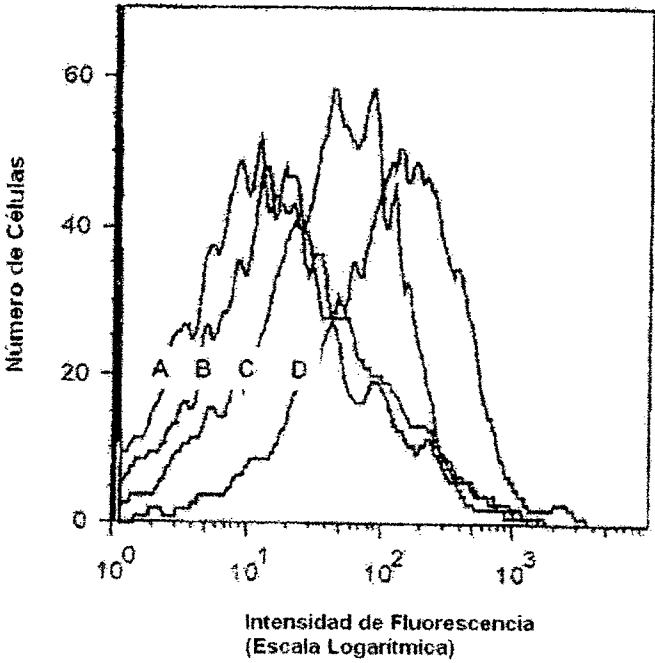


FIGURA 1

153

Este recibo debe ser utilizado
Únicamente para tramites de
MARIO DELGADO ECHEVERRY e Hija Ltda.
PCT/US2007/077300

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 23,454
FECHA : MARZO 26 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-032342- -00000-0000

Fecha: 2009-03-30 14:43:09 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 154

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
MARIO DELGADO ECHEVERRY	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	98547363	26/03/2009	11,734,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			875,000.00
		TOTAL :	875,000.00

SON: OCHOCIENTOS SETENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 23,449
FECHA : MARZO 26 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-032342- -00000-0000

Fecha: 2009-03-30 14:43:09 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 154

***** CONSIGNACION *****

POSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
MARIO DELGADO ECHEVERRY	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	98547363	26/03/2009	11,734,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecel

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-032342- -00000-0000

Fecha: 2009-03-30 14:43:09 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 154

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sid.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
DELGADO VILLEGAS JAIME EDUARDO

REFERENCIA	Radicación No.	9 32342
	Solicitud internacional	PCT/US2007/077300
	Fecha inicio fase nacional	30/03/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	~5128

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

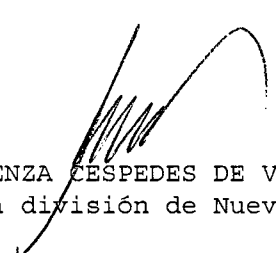
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 32342



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 08 MAYO 2009
jfernand