

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 047**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 31/7072 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05824135 .7**
96 Fecha de presentación: **02.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1807107**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54 Título: **APTÁMEROS ESTABILIZADOS PARA FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS Y SU USO COMO AGENTES TERAPÉUTICOS ONCOLÓGICOS.**

30 Prioridad:
02.11.2004 US 980211
30.11.2004 US 632358 P
01.12.2004 US 632609 P
10.02.2005 US 652496 P
11.02.2005 US 652494 P
01.04.2005 US 667866 P
15.04.2005 US 672200 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.01.2012

73 Titular/es:
ARCHEMIX CORP.
ONE HAMPSHIRE STREET
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:
PREISS, Jeffrey;
WILSON, Charles;
STANTON, Martin;
DIENER, John;
EPSTEIN, David;
McCAULEY, Dilara y
MCCAULEY, Thomas

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 373 047 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aptámeros estabilizados para factor de crecimiento derivado de plaquetas y su uso como agentes terapéuticos oncológicos

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere generalmente al campo de los ácidos nucleicos y más particularmente a aptámeros que pueden unirse al factor de crecimiento derivado de plaquetas ("PDGF") útiles como agentes terapéuticos en oncología y/u otras enfermedades o trastornos en los que participa PDGF. La invención se refiere además a materiales y a procedimientos para la administración de aptámeros que pueden unirse al factor de crecimiento derivado de plaquetas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que tienen afinidad de unión específica por moléculas mediante interacciones distintas del apareamiento de bases de Watson-Crick clásico.

[0003] Los aptámeros, al igual que los péptidos generados por expresión en fago o anticuerpos monoclonales ("mAbs"), pueden unirse específicamente a dianas seleccionadas y modular la actividad de la diana o interacciones de unión, por ejemplo, mediante la unión de aptámeros puede bloquearse el funcionamiento de la capacidad de su diana. Descubiertos por un procedimiento de selección *in vitro* de conjuntos de oligonucleótidos de secuencias al azar, se han generado aptámeros para más de 130 proteínas que incluyen factores de crecimiento, factores de transcripción, enzimas, inmunoglobulinas y receptores. Un aptámero típico tiene 10-15 kDa de tamaño (20-45 nucleótidos), se une a su diana con afinidad nanomolar a subnanomolar y discrimina a dianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, los aptámeros no se unirán normalmente a otras proteínas de la misma familia de genes). Una serie de estudios estructurales ha mostrado que los aptámeros pueden usar los mismos tipos de interacciones de unión (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, complementariedades electrostáticas, contactos hidrófobos, exclusión estérica) que accionan la afinidad y la especificidad en inmunocomplejos.

[0004] Los aptámeros tienen varias características deseables para su uso como agentes terapéuticos (y de diagnóstico) que incluyen alta especificidad y afinidad, eficacia biológica y excelentes propiedades farmacocinéticas. Además, ofrecen ventajas competitivas específicas con respecto a anticuerpos y otros agentes biológicos proteicos, por ejemplo:

[0005] 1) Velocidad y control. Los aptámeros se producen por un procedimiento completamente *in vitro* que permite la rápida generación de cabezas de serie iniciales, que incluyen cabezas de serie terapéuticas. La selección *in vitro* permite que la especificidad y la afinidad del aptámero se controle exhaustivamente y permite la generación de cabezas de serie contra dianas tanto tóxicas como no inmunogénicas.

[0006] 2) Toxicidad e inmunogenicidad. Los aptámeros como clase han demostrado toxicidad terapéuticamente aceptable y carecen de inmunogenicidad. Mientras que la eficacia de muchos anticuerpos monoclonales puede estar gravemente limitada por la respuesta inmunitaria a los propios anticuerpos, es extremadamente difícil provocar anticuerpos dirigidos contra aptámeros, lo más probablemente debido a que los aptámeros no pueden ser presentados por linfocitos T mediante el MHC y la respuesta inmunitaria está generalmente entrenada para no reconocer fragmentos de ácido nucleico.

[0007] 3) Administración. Mientras que la mayoría de los agentes terapéuticos de anticuerpos actualmente aprobados se administran por infusión intravenosa (normalmente durante 2-4 horas), los aptámeros pueden administrarse por inyección subcutánea (la biodisponibilidad del aptámero por administración subcutánea es >80% en estudios en mono (Tucker y col., J. Chromatography B. 732: 203-212, 1999)). Con buena solubilidad (>150 mg/ml) y peso molecular comparativamente bajo (aptámero: 10-50 kDa; anticuerpo: 150 kDa), una dosis semanal de aptámero puede administrarse por inyección en un volumen inferior a 0,5 ml. Además, el pequeño tamaño de los aptámeros permite que penetren en el área de limitaciones conformacionales que no permite que penetren anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, que presenta todavía otra ventaja de los agentes terapéuticos basados en aptámeros o profilaxis.

[0008] 4) Escalabilidad y coste. Los aptámeros terapéuticos se sintetizan químicamente y por consiguiente pueden escalarse fácilmente según se necesite para cumplir la demanda de producción. Mientras que las dificultades en el escalado de la producción están limitando actualmente la disponibilidad de algunos agentes biológicos y el coste de capital de una planta de producción de proteínas a gran escala es enorme, un único sintetizador de oligonucleótidos a gran escala puede producir más de 100 kg/año y requiere una inversión inicial relativamente modesta. El coste actual de los artículos para la síntesis de aptámeros a la escala de kilogramo se estima en 500 \$/g, comparable al de anticuerpos altamente optimizados. Se esperan mejoras continuas en el desarrollo de procedimientos para reducir el coste de los artículos a < 100 \$/g en cinco años.

[0009] 5) Estabilidad. Los aptámeros terapéuticos son químicamente consistentes. Están intrínsecamente adaptados para recuperar la actividad tras la exposición a factores tales como calor y desnaturalizantes y pueden almacenarse durante periodos prolongados (>1 año) a temperatura ambiente como polvos liofilizados.

5 Presión del líquido intersticial

[0010] Los tres tipos de tratamiento contra el cáncer más comunes son extirpación quirúrgica de tejido canceroso, radioterapia para destruir tejido canceroso y quimioterapia. Estos tratamientos tienen como objetivo extirpar los tejidos o células cancerosas o destruirlos en el cuerpo con agentes terapéuticos u otros agentes. La quimioterapia sigue siendo una modalidad de tratamiento importante para tumores sólidos. Para reducir posiblemente los efectos secundarios tóxicos y para lograr mayor eficacia de fármacos quimioterapéuticos, son altamente deseables estrategias para mejorar la distribución de fármacos entre tejidos normales y tumores.

[0011] Un obstáculo importante en el tratamiento de tumores sólidos es la captación limitada de agentes terapéuticos en el tejido tumoral. La presión del líquido intersticial ("PLI") elevada es una de las propiedades fisiológicamente características de tumores sólidos que se diferencian de tejido conjuntivo sano y se considera que es el principal obstáculo que limita la difusión libre de agentes terapéuticos en tumores sólidos. Los receptores de PDGF, particularmente PDGF- β , participan en la regulación de la PLI. Cuando un tumor entra en un estado hiperproliferativo, el oxígeno que suministra la sangre y otros nutrientes no pueden continuar con las demandas del tumor y resulta un estado de hipoxia. La hipoxia desencadena una "cambio angiogénico" que regula por incremento la expresión de varios factores, que incluyen VEGF y PDGF, que a su vez sirven para iniciar la angiogénesis. Sin embargo, la angiogénesis que resulta forma una vasculatura tumor anormal. La vasculatura tumoral se altera hasta el punto que no puede drenar adecuadamente el exceso de líquido del intersticio y la acumulación de líquido hincha la matriz intersticial elástica causando un aumento en la presión. Si la presión supera la resistencia de la pared capilar, se produce compresión y aumenta la resistencia a la circulación sanguínea.

[0012] Se ha sugerido esta propiedad de la mayoría de los tumores sólidos, la hipertensión intersticial tumoral o PLI elevada, como una posible diana por un esfuerzo por aumentar la captación de fármaco por el tumor (Jain y col., (1987) Cancer Res., 47:3039-3051). La PLI elevada actúa de barrera para el transporte transvascular (Jain y col. (1997), Adv. Drug Deliv. Rev. 26:71-90). Se ha mostrado que la reducción de PLI tumoral, o modulación de la presión microvascular, aumenta el transporte transvascular de anticuerpos que eligen tumor como diana o compuestos trazadores de bajo peso molecular (Pietras y col., (2001), Cancer Res., 61, 2929-2934). La etiología de la hipertensión intersticial en los tumores se entiende muy poco. Una teoría propuesta es que la falta de vasos linfáticos en los tumores es un factor contribuyente al aumento de la PLI tumoral (Jain y col., (1987), Cancer Res., 47:3039-3051). Otra teoría propuesta es que es probable que la microvasculatura y el compartimento de estroma de sostén sean importantes determinantes para la PLI tumoral (Pietras y col., (2002) Cancer Res., 62: 5476-5484). Cada vez hay más pruebas de la tirosina cinasa del receptor de PDGF β transmembrana como una posible diana para agentes terapéuticos farmacológicos para modular la hipertensión intersticial tumoral. Entre otras posibles dianas están los factores de crecimiento que se unen al receptor de PDGF β .

Cáncer mediado por PDGF

[0013] Además de la PLI y la dificultad de penetrar tumores con agentes terapéuticos, otro obstáculo en el tratamiento contra el cáncer son las mutaciones en ciertas formas de cáncer mediadas por PDGF que conducen a expresión constitutiva de PDGF. Estas mutaciones accionan la proliferación de células anormales que producen las diversas formas de cáncer como se muestra en la Figura 1 (Pietras y col., (2001), Cancer Res., 61, 2929-2934). Una mutación genética produce la amplificación de receptores de PDGF- α en glioblastomas de alto grado. En leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), la activación constitutiva de receptores de PDGF- β resulta de una mutación que produce la fusión de receptores con proteínas distintas de PDGF (Golub y col., (1994) Cell 77, 30 7-316, Magnusson y col., (2001) Blood 100, 623-626). La activación constitutiva del receptor de PDGF- α debido a la activación de mutaciones puntuales también se ha identificado en pacientes con tumores del estroma gastrointestinal (GIST) (Heinreich y col., (2003) Science 299, 708-710). El dermatofibrosarcoma protuberante (DFSP) está asociado a la producción constitutiva de proteínas de fusión que se procesan en PDGF-BB (O'Brian y col., (1998) Gene Chrom. Cancer 23, 187-193; Shimiziu y col. (1999) Cancer Res. 59. 3719-3723; Simon y col. (1997) Nat. Genet., 15, 95-98). Además de la activación constitutiva del ligando y/o receptor de PDGF debido a mutaciones, se ha mostrado regulación por incremento en sarcomas de tejido blando y gliomas (Ostman y Heldin, (2001), Adv. Cancer Res. 80, 1-38).

PDGF

[0014] Los factores de crecimiento son sustancias que tienen un efecto proliferativo de células sobre células o tejidos. Un factor de crecimiento dado puede tener más de un receptor o inducir proliferación celular en más de una línea celular o tejido. El PDGF pertenece a la familia de los factores de crecimiento del nudo de cisteína y originalmente se aisló de plaquetas para promover actividad mitogénica y migratoria celular. El PDGF es un mitógeno fuerte y tiene una función fundamental en la regulación de proliferación celular normal tal como fibroblastos, células de tejido liso, células de la neuroglía y células de tejido conjuntivo. Además, el PDGF media en

el crecimiento celular patológico tal como en trastornos proliferativos, y también desempeña una función en angiogénesis. Otro factor de crecimiento implicado en la angiogénesis de tumores es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

5 **[0015]** Se han identificado cuatro cadenas de polipéptidos de PDGF que se sabe que actualmente constituyen cinco isoformas de PDGF dímeros: PDGF-AA, -BB, -CC, -DD y -AB. Las especies más abundantes son PDGF-AB y -BB. Las isoformas de PDGF se unen a receptores α y β de tirosina cinasa. Los receptores de PDGF se expresan por muchos tipos diferentes de células dentro de tumores. La unión de isoformas de PDGF a sus receptores relacionados induce la dimerización y posterior fosforilación de residuos específicos en el dominio de tirosina cinasa intracelular de los receptores y la activación de la ruta de señalización. Las isoformas de PDGF -AA, -BB, -CC y -AB inducen la dimerización de receptores α de PDGF. PDGF-BB y PDGF-DD activan la dimerización de receptores β de PDGF. Toda las isoformas de PDGF, excepto PDGF-AA, activan tanto los receptores α como β en células que co - expresan ambos tipos de receptores (Figura 2). Debido a que son potentes mitógenos, las isoformas de PDGF se han elegido como diana para el desarrollo de agentes terapéuticos para enfermedad proliferativa tal como cáncer, retinopatía diabética, glomerulonefritis y reestenosis.

10 **[0016]** El PDGF, que es secretado por células endoteliales, actúa de mitógeno directo para fibroblastos, recluta pericitos y estimula células vasculares de tejido liso. Muchos tumores sólidos muestran señalización paracrina de PDGF en el estroma del tumor. Se sabe que el PDGF regula por incremento la síntesis de colágeno y media en interacciones de proteínas de anclaje tales como integrinas con componentes de la matriz extracelular (ECM). Las interacciones de PDGF entre tejido conjuntivo, ECM y sistemas de filamentos de actina intracelular producen un aumento de la resistencia a la tracción que contribuye a PLI alta. La PLI alta se localiza en el sitio de tumor y está asociada a un mal pronóstico en cánceres humanos ya que aumenta con el tamaño y la gravedad del tumor y el grado de malignidad. La función de señalización de PDGF en el control de PLI y la expresión regulada por incremento en diversos tumores sólidos ha promovido la investigación de si la inhibición de la señalización de PDGF puede disminuir PLI y así aumentar la captación de fármaco en tumores sólidos. Un trabajo previo ha demostrado que la inhibición de la señalización de PDGF con antagonistas de receptores de moléculas pequeñas y un aptámero específico para PDGF disminuye la presión del fluido intersticial y aumenta la captación de agentes quimioterapéuticos en tumores sólidos (Pietras y col., (2001), Cancer Res., 61: 2929-2934). El documento WO 01/87351 A describe un procedimiento para tratar tumores sólidos que comprende administrar una composición de un aptámero de PDGF y un agente citotóxico. El aptámero de PDGF se identificó usando el procedimiento SELEX. Se describe un procedimiento para reducir la presión del líquido intersticial de un tumor sólido que comprende administrar un aptámero de PDGF. También se describe un procedimiento para aumentar la captación de agentes citotóxicos en un tumor que comprende administrar una composición que comprende un aptámero de PDGF y un agente citotóxico.

20 El documento US-B1-6 229 002 desvela un procedimiento para preparar un complejo que consiste en un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto molecular no inmunogénico de alto peso o compuesto lipófilo identificando un ligando de ácido nucleico de PDGF por metodología SELEX y asociando el ligando de ácido nucleico de PDGF a un compuesto molecular no inmunogénico de alto peso o compuesto lipófilo.

25 El documento WO 2004/064760 describe composiciones terapéuticas de ácido nucleico que se informa que pueden unirse a citocinas, factores de crecimiento y proteínas de la superficie celular, individualmente o en combinaciones de dos o más, y procedimientos para administrar estos agentes terapéuticos de ácido nucleico en el tratamiento de glaucoma y otras enfermedades proliferativas del ojo.

30 El documento WO2004/050899 describe materiales y procedimientos para producir agentes terapéuticos de aptámeros que tienen nucleótidos trifosfato modificados incorporados en su secuencia. Se establece que los aptámeros producidos mediante los procedimientos de la invención tienen una estabilidad y semivida elevada.

35 Pietras y col. (Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor efecto of chemotherapy; Cancer Research, EE.UU., vol 62, nº 19, 1 de octubre de 2002, páginas 5476-5484) investigan los efectos de antagonistas de PDGF sobre la respuesta de quimioterapia en dos modelos de tumor que muestran expresión de receptores de PDGF limitada al estroma del tumor, y en los que los antagonistas de PDGF alivian la hipertensión tumoral. Se encontró que los aptámeros de PDGF inhibidores y el inhibidor de tirosina cinasas de los receptores de PDGF STI571 potenciaban el efecto antitumoral del taxol en tumores KAT-4 s.c. en ratones SCID. El tratamiento con sólo antagonistas de PDGF no tuvo efecto sobre el crecimiento del tumor. La captación de taxol en tumores se aumentó mediante el tratamiento con antagonistas de PDGF. El cotratamiento con antagonistas de PDGF y taxol no se asoció a efectos antiangiogénicos, y los antagonistas de PDGF no potenciaron el efecto del taxol sobre el crecimiento *in vitro* de células KAT-4. STI571 también aumentó los efectos antitumorales de 5-fluorouracilo sobre tumores PROb s.c. en ratas BDIX singeneicas sin aumentar el efecto de 5-fluorouracilo sobre células PROb cultivadas.

40 Green y col. (Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain. Biochemistry, vol 35, nº 45, 1996, páginas 14413-14424) identificaron moléculas de ADN que se unían a PDGF-AB con afinidad subnanomolar de una biblioteca de ADN al azar usando selección *in vitro*. Se encontró que los ligandos individuales clonados del conjunto enriquecido por afinidad se unían a PDGF-AB y PDGF-BB con afinidad comparablemente alta ($K_d \approx 10^{-10}$ M) y a

PDGF-AA con menor afinidad ($>10^{-8}$ M), que indica reconocimiento específico de la cadena B de PDGF en el contexto del hetero- u homodímero. Green y col. establecen que esos ligandos de ADN representan una clase novedosa de antagonistas específicos y potentes de PDGF-BB y, por inferencia, PDGF-AB.

5 Fang y col. (Synthetic DNA aptamers to detect protein molecular variant in a high-throughput fluorescence quenching assay. *Chembiochem- A European Journal of Chemical Biology*. Vol 4, nº 9, 5 de septiembre de 2003, páginas 829-834) describen el desarrollo de un ensayo basado en fluorescencia con aptámeros de ADN sintético que pueden detectar y distinguir variantes moleculares de proteínas en muestras biológicas en un procedimiento a alto rendimiento. Fang y col. usaron un aptámero con alta afinidad por la cadena B de PDGF, marcado con un fluoróforo
10 y un extintor de fluorescencia en los dos extremos, y la fluorescencia se midió extinguiéndola con PDGF. Fang y col. informan que la extinción específica puede usarse para detectar PDGF a concentraciones picomolares incluso en presencia de suero y otras proteínas derivadas de células en medios de cultivo celular. Los autores también establecen que los dímeros PDGF-AA, -AB y -BB pueden distinguirse entre sí.

15 **[0017]** Por consiguiente, sería beneficioso tener materiales y procedimientos novedosos en la terapia en oncología para reducir la PLI tumoral, disminuir la angiogénesis tumoral y reducir los efectos perjudiciales de la mutación por la expresión constitutiva de PDGF. La presente divulgación proporciona materiales y procedimientos para cumplir estas y otras necesidades.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0018] La Figura 1 es un esquema de mutaciones de genes que dan lugar a señalización constitutiva de receptores de PDGF en células cancerosas encontradas en glioblastomas, leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), dermatofibrosarcoma protuberante (DFSP), tumores del estroma gastrointestinal (TEGI) y otros sarcomas de tejido blando.
25

[0019] La Figura 2 es un esquema de isoformas AA, BB, CC, DD y AB de PDGF y receptores relacionados.

[0020] La Figura 3 es una representación esquemática del procedimiento de selección de aptámeros *in vitro* (SELEX™) a partir de conjuntos de oligonucleótidos de secuencias al azar.
30

[0021] La Figura 4 es un esquema del transporte de citotoxinas a través de la vasculatura tumoral con y sin antagonistas de PDGF mediante los procedimientos de la presente divulgación.

35 **[0022]** La Figura 5 es una ilustración de un reactivo de PEG ramificado para acoplarse a una biomolécula.

[0023] La Figura 6 es una ilustración de un PEG ramificado conjugado con el extremo 5' de un aptámero.

[0024] La Figura 7 es una ilustración que representa diversas estrategias de PEGilación que representan mono-PEGilación convencional, PEGilación múltiple y dimerización por PEGilación.
40

[0025] La Figura 8A es un gráfico de un análisis de HPLC de intercambio iónico de ARC127 (5'-[PEG de 40 K]-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3'-dT-3') recientemente sintetizado y guardado a -20°C durante dos años; la Figura 8B es un gráfico de barras de los resultados del ensayo de proliferación de células 3T3 para ARC126 (5'-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3'-dT-3') y ARC127 recientemente sintetizados (Archemix) y después de almacenamiento a -20°C durante 2 años (Proligo).
45

[0026] La Figura 9A, panel izquierdo, es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de la composición de aptámero de PDGF que contiene 2'-flúor de ARC126; la Figura 9A, panel derecho, es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de la variante de ARC126 ARC513 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N° 70) -3'-dT-3'); la Figura 9B es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de variantes de ARC 126 ARC513 (5' -(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N° 70) -3'-dT-3'), ARC514 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N°: 71) -3'-dT-3'), ARC515 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N°: 72) -3'-dT-3') y ARC516 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N°: 73) -3'-dT-3').
50
55

[0027] La Figura 10A es un gráfico de los resultados del ensayo de unión por competencia para ARC 126 y las variantes de composición ARC 128 (5'-(SEC ID N°: 4)-HEG-(SEC ID N°: 5)-HEG-(SEC ID N°: 6) -3'), ARC513, ARC514, ARC515, ARC516; la Figura 10B es un gráfico de los datos del ensayo de proliferación basada en células 3T3 *in vitro* que muestran la actividad de algunas variantes de composición de ARC126.
60

[0028] La Figura 11A es un gráfico de un ensayo de unión por competencia para ARC126 y dos variantes que están conjugadas en 5' con grupos PEG de 30 kDa (ARC308, 5'-[PEG de 30 K]-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)- 3'-dT-3') o 40 kDa (ARC127); la Figura 11B es un gráfico de los datos del ensayo de proliferación basada en células 3T3 *in vitro* para ARC126 en función de la conjugación con el grupo PEG en 5' (ARC126 + 30 kDa = ARC308 y ARC126 + PEG de 40 kDa = ARC127).
65

- 5 [0029] La Figura 12A es un gráfico de un perfil farmacocinético de conjugados en 5' de ARC126 después de la administración IV a 10 mg/kg en ratones; la Figura 12B es un gráfico del perfil farmacocinético *in vivo* de ARC127 (ARC 126 + PEG de 40 kDa) después de la administración intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) y subcutánea (SC) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones; la Figura 12C es un gráfico del perfil de bioactividad de ARC126+ PEG de 40 kDa (es decir, ARC127) después de la administración intravenosa (IV) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones.
- 10 [0030] La Figura 13A es un gráfico de un ensayo de unión por competencia que muestra que ARC126 se une a PDGF-BB con una K_d de aproximadamente 100 pM y PDGF-AB con una K_d de aproximadamente 100 pM, pero no se une a PDGF-AA; la Fig. 13B es un gráfico de un ensayo de unión por competencia que muestra que ARC126 se une a PDGF-BB humano, de rata y ratón con una afinidad igual de aproximadamente 100 pM.
- 15 [0031] La Figura 14A es un gráfico de los resultados de un ensayo de proliferación de células 3T3 que muestra que ARC127 inhibe la proliferación de células 3T3 mejor que el anticuerpo dirigido contra Neutralizante de PDGF; la Figura 14B es un gráfico de los resultados de un ensayo de proliferación de células 3T3 que muestra que ARC127 inhibe la proliferación de células 3T3 mejor que los inhibidores de tirosina cinasas conocidos probados (AG-1295 en el panel izquierdo y AG-1433 en el panel derecho).
- 20 [0032] La Figura 15 es un gráfico de los resultados del ensayo de viabilidad celular que muestra que ARC127 solo no tiene ningún efecto tóxico sobre células 3T3 después de incubación durante 24 ó 48 horas.
- 25 [0033] La Figura 16 es un gráfico de datos del ensayo de migración de células realizado en una forma de 96 pocillos usando el ensayo de migración en 96 pocillos QCM Chemotaxis (n° ECM 510) (Chemicon, Temecula, CA); la Figura 16A muestra que la señal de migración observada aumenta en función del número de células sembradas, y la Figura 16B muestra la señal de migración en función del aumento de la concentración de PDGF.
- 30 [0034] La Figura 17 es un gráfico de los resultados de un ensayo de Elk luciferasa accionado por PDGF que muestra que ARC127 muestra una CI_{50} de 2 nM.
- 35 [0035] La Figura 18A es un gráfico del diámetro del tumor frente al tiempo en ratones sin pelo Nu/Nu bajo un estudio de optimización de dosis de GLEEVEC[™]/irinotecan en el modelo de xenoinjerto de cáncer de colon HT29; la Figura 18B es un gráfico del diámetro del tumor frente al tiempo en ratones sin pelo Nu/Nu bajo el estudio de ARC 127/irinotecan en el modelo de xenoinjerto de cáncer de colon LS174T. La Figura 18C es un gráfico del volumen del tumor frente al tiempo en ratones sin pelo Nu/Nu bajo el estudio de ARC 127/irinotecan en el modelo de xenoinjerto de cáncer de colon LS174T.
- 40 [0036] La Figura 19A es un gráfico del diámetro del tumor frente al tiempo en ratones sin pelo Nu/Nu bajo pautas de dosificación de ARC308/irinotecan y ARC308/GLEEVEC en un estudio de eficacia en el modelo de xenotrasplante de cáncer de colon LS174T. La Figura 19B es un gráfico del volumen del tumor frente al tiempo en ratones sin pelo Nu/Nu bajo pautas de dosificación de ARC308/irinotecan en un estudio de eficacia en el modelo de xenotrasplante de cáncer de colon LS174T.
- 45 [0037] La Figura 20A es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de un aptámero que se une a VEGF pero no a PDGF – denominado en este documento ARC245 (SEC ID N°: 7); la Figura 20B es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de un aptámero que se une a PDGF pero no a VEGF - denominado en este documento ARC126 (5'-SEC ID N° 1-HEG-SEC ID N° 2-HEG-SEC ID N° 3 en la que HEG representa amidita de hexaetilenglicol.
- 50 [0038] La Figura 21A es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de un aptámero bivalente que se une a PDGF y VEGF (secuencia TK.131.012.A, SEC ID N°: 9); la Figura 21B es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de un segundo aptámero bivalente que se une a PDGF y VEGF (secuencia TK.131.012B, SEC ID N°: 10).
- 55 [0039] La Figura 22 es un gráfico de datos de unión del ensayo de transferencia puntual para los aptámeros constituyentes y los aptámeros multivalentes para PDGF-BB (panel 1) y VEGF (panel 2).
- 60 [0040] La Figura 23 es un esquema de la secuencia y estructuras secundarias (ausente una indicación de los enlaces fosforotioato) de aptámeros de PDGF que tienen islas de CpG o motivos incorporados o insertados en ellos.
- 65 [0041] La Figura 24A es un gráfico de los resultados de un ensayo de ELISA de IL-6 que mide la liberación de IL-6 en células TIB usando ODN inmunoestimulantes conocidos como controles positivos y aptámeros que no contienen islas de CpG como controles negativos en el ensayo; la Figura 24B es un gráfico de los resultados de un ensayo de ELISA de IL-6 que mide la liberación de IL-6 en células TIB usando los ISS-ODN y versiones acortadas de ISS-ODN; la Figura 24C es un gráfico de los resultados de un ensayo de ELISA de IL-6 que mide la liberación de IL-6 en células TIB usando aptámeros de PDGF en los que se han incorporados motivos CpG; la Figura 24D es un

gráfico de los resultados de un ensayo de ELISA de IL-6 que mide la liberación de IL-6 en células TIB usando aptámeros de PDGF adicionales en los que se han incorporados motivos CpG. La Figura 24E es un gráfico de los resultados de un ensayo de ELISA de TNFa que mide la liberación de TNFa en células TIB usando los mismos aptámeros de PDGF que en la Figura 24D en la que se han incorporados motivos CpG.

5 **[0042]** Las Figuras 25A-25B son gráficas que representan los análisis de unión por transferencia puntual para transcritos de ARN de clones.

10 **[0043]** La Figura 26 es un gráfico que representa el efecto inhibitor de diversos aptámeros de PDGF-AA de la divulgación (ARX33P1.D2 (SEC ID N°: 78), ARX33P1.E5 (SEC ID N°: 79) y ARX33P1.E10 (SEC ID N°: 80)) sobre la proliferación de células 3T3 inducida por PDGF-AA.

15 **[0044]** La Figura 27 es un gráfico que representa el efecto de aptámeros de PDGF-AA (ARX33P1.D2 (SEC ID N°: 78), ARX33P1.E5 (SEC ID N°: 79) y ARX33P1.E10 (SEC ID N°: 80)) sobre la proliferación de células 3T3 inducida por PDGF-BB.

[0045] La Figura 28 es un gráfico del volumen del tumor frente al tiempo (periodo pos-dosificación) en ratones sin pelo Nu/Nu bajo el estudio de ARC127/irinotecan en modelo de xenoinjerto de cáncer de colon LS174T.

20 **[0046]** La Figura 29 es una representación de Kaplan-Meier de los datos mostrados en la Figura 28 en la que se presenta el porcentaje de ratones en un grupo de tratamiento que presenta tumores inferiores a 500 mm^3 [como se calcula a partir de mediciones con compás calibrador digital de la longitud y el ancho de los tumores, usando la siguiente fórmula: volumen = (longitud x ancho²)/2].

25 **[0047]** La Figura 30 es un gráfico que muestra el volumen medio del tumor por grupo (eje vertical) frente a días después de la implantación del tumor (eje horizontal) para tumores LS174T que se han tratado con vehículo o ARC593.

30 **[0048]** La Figura 31 es un gráfico que muestra los valores medios para la densidad de área para vasos sanguíneos teñidos con CD31 y pericitos inmunorreactivos de α -SMA de un modelo de carcinoma pulmonar de Lewis de ratón en el que los ratones se habían tratado con vehículo, el aptámero ARC308 o el aptámero ARC594.

35 **[0049]** La Figura 32 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra CD31 y teñido con anticuerpo dirigido contra colágeno tipo IV que se había tratado con vehículo, ARC308 o ARC594. En el gráfico: * = $P < 0,05$ frente a vehículo, † = $P < 0,05$ frente a aptámero 308.

40 **[0050]** La Figura 33 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra CD31, teñido con anticuerpo dirigido contra PDGFR-beta, teñido con anticuerpo dirigido contra α -SMA, teñido con anticuerpo dirigido contra NG2 o teñido con anticuerpo dirigido contra desmina de ratones que se han tratado con vehículo, ARC308 (indicado como AX101) o ARC594 (indicado como AX102). En el gráfico: * = $P < 0,05$ frente a vehículo, † = $P < 0,05$ frente a aptámero 308.

45 **[0051]** La Figura 34 es un gráfico que muestra la colocalización en porcentaje de CD31 y marcador de PDGFR-beta, CD31 y marcador de α -SMA, CD31 y marcador de NG2 y CD31 y marcador de desmina en carcinoma pulmonar de Lewis que se habían tratado con vehículo o ARC594 (indicado como AX102). En el gráfico: * = $< 0,05$ frente a vehículo.

50 **[0052]** La Figura 35 es un gráfico que muestra el número de vasos individuales (eje vertical) en carcinoma pulmonar de Lewis que se habían tratado con vehículo o ARC594 frente al intervalo de colocalización de CD31 y NG2 (eje horizontal) en los vasos.

55 **[0053]** La Figura 36 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra CD31 (barra izquierda) y teñido con anticuerpo dirigido contra colágeno tipo IV (barra derecha) que se había tratado con vehículo, 2 mg/kg, 10 mg/kg o 50 mg/kg de ARC594 en el que * = $P < 0,05$ frente a vehículo, † = $P < 0,05$ frente a 2 mg/kg de ARC594, ‡ = $P < 0,05$ frente a 10 mg/kg de ARC594 y § = $P < 0,05$ frente a 50 mg/kg de ARC594.

60 **[0054]** La Figura 37 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra CD31 y teñido con anticuerpo dirigido contra α -SMA que se había tratado con vehículo, 2 mg/kg, 10 mg/kg o 50 mg/kg de ARC594 en el que * = $P < 0,05$ frente a vehículo, † = $P < 0,05$ frente a 2 mg/kg de ARC594, ‡ = $P < 0,05$ frente a 10 mg/kg de ARC594 y § = $P < 0,05$ frente a 50 mg/kg de ARC594.

65 **[0055]** La Figura 38 es un gráfico que muestra la colocalización en porcentaje de tejido de carcinoma

pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra CD31 y teñido con anticuerpo dirigido contra α -SMA o teñido con anticuerpo dirigido contra CD32 y teñido con anticuerpo dirigido contra NG2 que se había tratado con vehículo, 2 mg/kg, 10 mg/kg o 50 mg/kg de ARC594 en el que * = $P < 0,05$ frente a vehículo y \$ = $P < 0,05$ frente a 50 mg/kg de ARC594.

5 [0056] La Figura 39 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra CD31, teñido con anticuerpo dirigido contra α -SMA y teñido con anticuerpo dirigido contra NG2 que se había tratado con ARC594 durante 1, 2, 4 ó 7 días en el que * = $P < 0,05$ frente a vehículo, † = $P < 0,05$ frente a 1 día de tratamiento, ‡ = $P < 0,05$ frente a 2 días de tratamiento y § = $P < 0,05$ frente a 4 días de tratamiento.

15 [0057] La Figura 40 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra α -SMA, NG2, PDGFR-beta y desmina que se había tratado con vehículo o ARC594 durante uno o siete días.

[0058] La Figura 41 es un gráfico que representa el volumen del tumor en función del día de tratamiento tanto con vehículo como con ARC594 (indicado como AX102).

20 [0059] La Figura 42 es un gráfico que muestra el peso del tumor peso en función del tiempo de tratamiento tanto con vehículo como con ARC594 (indicado como AX102).

[0060] La Figura 43 es un gráfico que muestra el peso corporal de ratón en función del tiempo de tratamiento tanto con vehículo como ARC594 (indicado como AX 102).

25 [0061] La Figura 44 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra CD31 (barra izquierda) y teñido con anticuerpo dirigido contra NG2 (barra derecha) que se había tratado con vehículo o ARC594 (indicado como AX102) durante hasta 28 días en el que * = $P < 0,05$ frente a vehículo, † = $P < 0,05$ frente a CD31.

30 [0062] La Figura 45 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) en el eje vertical de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra CD31 y teñido con anticuerpo dirigido contra PDGFR-beta que se había tratado con vehículo o ARC594 varias veces, hasta 28 días.

35 [0063] La Figura 46 es un gráfico que muestra la colocalización en porcentaje (eje vertical) de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra CD31 y teñido con anticuerpo dirigido contra PDGFR- β que se había tratado con vehículo (primera barra a la izquierda), con ARC594 durante 7 días (segunda barra) o con ARC594 durante 28 días (tercera barra).

40 [0064] La Figura 47 es un conjunto de tres gráficos de barras que muestran el porcentaje de vasos (eje vertical) frente al porcentaje de cobertura de pericitos (eje horizontal) para carcinoma pulmonar de Lewis que se había tratado con vehículo (panel superior), ARC594 (indicado como AX102) durante 7 días (panel central) o ARC594 (indicado como AX102) durante 28 días (panel inferior).

45 [0065] La Figura 48 es un gráfico que muestra el diámetro del vaso en μm (eje vertical) frente al tratamiento de carcinoma pulmonar de Lewis con vehículo o ARC594 durante 4, 7, 14, 21 ó 28 días (duración del tratamiento en el eje horizontal).

50 [0066] La Figura 49 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) en el eje vertical de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra colágeno tipo IV (indicado como Col IV), CD31 o PDGFR-beta que se había tratado con vehículo o ARC594 durante 1, 2, 4, 7, 14, 21 ó 28 días (duración del tratamiento en el eje horizontal).

55 [0067] La Figura 50 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) en el eje vertical de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra colágeno tipo IV (indicado como Col IV), laminina o nidogen que se había tratado con vehículo o ARC594 durante 7 ó 28 días (duración del tratamiento en el eje horizontal).

60 [0068] La Figura 51 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra α -SMA que se había tratado con vehículo, aptámero de control negativo (AX104) o 2 mg/kg, 10 mg/kg o 50 mg/kg de ARC594 en el que * = $P < 0,05$ frente a vehículo.

65 [0069] La Figura 52 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) de tejido de carcinoma pulmonar de Lewis teñido con anticuerpo dirigido contra α -SMA que se había tratado con vehículo o ARC594 durante 1, 2, 4 ó 7 días en el que * = $P < 0,05$ frente a vehículo.

[0070] La Figura 53 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) de tejido tumoral Rip-Tag2 teñido con anticuerpo dirigido contra CD31 (barra izquierda) y teñido con anticuerpo dirigido contra NG2 (barra derecha) tratado con vehículo, 2 mg/kg, 10 mg/kg o 50 mg/kg de ARC594 (indicado como AX102) en el que * = $P < 0,05$ frente a vehículo, † = $P < 0,05$ frente a 2 mg/kg de ARC594.

[0071] La Figura 54 es un gráfico que muestra la densidad de área (expresada como un porcentaje de control de vehículo) en el eje vertical de tejido tumoral Rip-Tag2 teñido con anticuerpo dirigido contra α -SMA y teñido con anticuerpo dirigido contra CD31 que se había tratado con vehículo o ARC594 durante 7, 14 ó 28 días (duración del tratamiento en el eje horizontal).

[0072] La Figura 55 es un gráfico de un ensayo de unión por competencia que muestra que ARC594 se une a PDGF-BB con una K_d de aproximadamente 100 pM y PDGF-AB con una K_d de aproximadamente 100 pM, pero no se une a PDGF AA.

[0073] La Figura 56A es un gráfico que representa la concentración en plasma de ARC594 en ratones en función del tiempo; la Figura 56B es una tabla que enumera propiedades farmacocinéticas de ARC594 (indicado como AX102) en ratones.

[0074] La Figura 57 es un perfil de bioactividad de ARC594 (indicado como AX 102) después de la administración intravenosa (IV) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones que muestra que el perfil farmacodinámico del aptámero es según sus datos farmacocinéticos.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0075] La presente invención proporciona un aptámero específico para PDGF según la reivindicación 1.

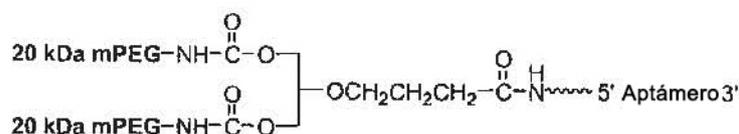
La presente invención también proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero según la reivindicación 8.

La presente invención también proporciona un PDGF específico La presente divulgación proporciona materiales y procedimientos para el tratamiento de cáncer, cánceres de tumor sólido en particular, por la administración a pacientes de cantidades terapéuticamente eficaces de aptámeros o composiciones de aptámero que pueden unirse con alta afinidad y especificidad a factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular, sus isoformas, sus receptores, o cualquier combinación de los mismos, alterando así, por ejemplo, inhibiendo la función biológica del ligando unido en la etiología del cáncer. Los aptámeros de la presente divulgación pueden usarse en combinación con agentes citotóxicos quimioterapéuticos conocidos y/u otros tratamientos contra el cáncer. Además, los aptámeros de la divulgación pueden incluir uno o más motivos CpG incorporados en su interior o unidos a los mismos.

[0076] La presente divulgación proporciona aptámeros que se unen a PDGF. En una realización, los aptámeros que se unen a PDGF incluyen una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 9 a SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 36 a SEC ID N°: 73, SEC ID N°: 85, SEC ID N°: 77 a SEC ID N°: 81 y SEC ID N° 86-89, 91, 93-95 y 102. En una realización, la secuencia de oligonucleótidos del aptámero contiene menos de siete nucleótidos que tienen un sustituyente 2'-flúor.

[0077] En otra realización, los aptámeros de la divulgación comprenden al menos una modificación química adicional. En una realización, la modificación se selecciona del grupo que consiste en una sustitución química en una posición de azúcar; una sustitución química en una posición de fosfato; y una sustitución química en una posición de base, del ácido nucleico. En una realización particular, la modificación se selecciona del grupo que consiste en: incorporación de un nucleótido modificado, taponamiento del extremo 3', conjugación con un compuesto no inmunogénico de alto peso molecular y conjugación con un compuesto lipófilo. En una realización particular, el compuesto no inmunogénico de alto peso molecular es polialquilenglicol, particularmente polietilenglicol. Por ejemplo, el compuesto no inmunogénico de alto peso molecular es amidita de hexaetilenglicol (HEG).

[0078] En una realización particular, el aptámero específico para PDGF de la divulgación comprende la siguiente estructura:

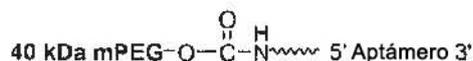


en la que

~~~~~indica un ligador

5 Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG (SEC ID N°: 69) - PEG - dCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N°: 40) - PEG - TdGdATmCdCTmGmGmG-3T-3' (SEC ID N°: 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, PEG denota un espaciador de PEG y 3T denota una tapa de desoxi-timidina invertida.

10 **[0079]** En otra realización, el aptámero específico para PDGF de la divulgación comprende la siguiente estructura:

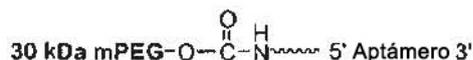


en la que ~~~~~

15 indica un ligador

20 Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCdTAdCmG (SEC ID N°: 69) - PEG - dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N°: 40) - PEG - dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG-3T-3' (SEC ID N°: 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, PEG denota un espaciador de PEG y 3T denota una tapa de desoxi-timidina invertida.

25 **[0080]** En otra realización, el aptámero específico para PDGF de la divulgación comprende la siguiente estructura:

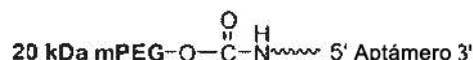


25 en la que

~~~~~ indica un ligador

30 Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCdTAdCmG (SEC ID N°: 69) - PEG - dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N°: 40) - PEG - dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG -3T-3' (SEC ID N°: 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, PEG denota un espaciador de PEG y 3T denota una tapa de desoxi-timidina invertida.

35 **[0081]** En otra realización, el aptámero específico para PDGF de la divulgación comprende la siguiente estructura:

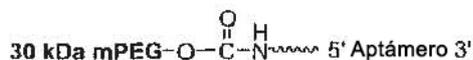


40 en la que

40 ~~~~~ indica un ligador

45 Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCdTAdCmG (SEC ID N°: 69) - PEG - dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N°: 40) - PEG - dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG-3T-3' (SEC ID N°: 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, PEG denota un espaciador de PEG y 3T denota una tapa de desoxi-timidina invertida.

[0082] En otra realización particular, el aptámero específico para PDGF de la divulgación comprende la siguiente estructura:



50 en la que

~~~~~ indica un ligador

Aptámero= 5'dCdAdGdGdCfUdAfCmG (SEC ID N°: 1)- HEG - dCdGTdAmGdAmGdCdAfUfCmA (SEC ID N°: 2) - HEG - TdGdATfCfUmG-3T-3' (SEC ID N°: 3); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, HEG denota un espaciador de amidita de hexaetilenglicol (HEG) y 3T denota una desoxi-timidina invertida.

**[0083]** En otra realización, el aptámero específico para PDGF de la divulgación comprende una de las dos siguientes estructuras:



en la que

~~~~~ indica un ligador

Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG (SEC ID N°: 69) - PEG - dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N°: 40) - PEG - dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG 3' (SEC ID N°: 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido y PEG denota un espaciador de PEG; o



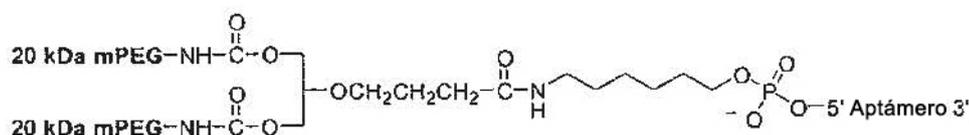
en la que

~~~~~ indica un ligador

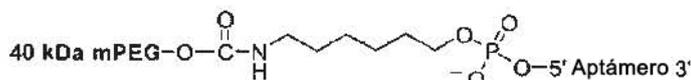
Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG (SEC ID N°: 69) - PEG - dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N°: 40) - PEG - dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG 3' (SEC ID N°: 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido y PEG denota un espaciador de PEG.

**[0084]** En algunas realizaciones de este aspecto de la divulgación, el ligador es un ligador de alquilo. En realizaciones particulares, el ligador de alquilo comprende 2 a 18 grupos CH<sub>2</sub> consecutivos. En realizaciones preferidas, el ligador de alquilo comprende 2 a 12 grupos CH<sub>2</sub> consecutivos. En realizaciones particularmente preferidas, el ligador de alquilo comprende 3 a 6 grupos CH<sub>2</sub> consecutivos.

**[0085]** En realizaciones particulares, el aptámero de la divulgación comprende una de las siguientes estructuras:



en la que Aptámero= 5'dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG (SEC ID N°: 69) - PEG - dCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N°: 40) - PEG - TdGdATmCdCTmGmGmG-3T-3' (SEC ID N°: 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, PEG denota un espaciador de PEG y 3T denota una tapa de desoxi-timidina invertida (en este documento, la estructura anterior se denomina en lo sucesivo ARC594 o AX102);



en la que Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG (SEC ID N°: 69) - PEG - dCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmA



- 5 **[0088]** La divulgación también proporciona aptámeros que incluyen una primera secuencia que se une a una primera diana y una segunda secuencia que se une a una segunda diana. En una realización, la primera diana es PDGF, isoformas de PDGF o un receptor de PDGF, y la segunda diana es VEGF o un receptor de VEGF. Las isoformas de PDGF son, por ejemplo, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC y PDGF-DD. Los aptámeros se unen, por ejemplo, a uno o más de PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, PDGF-DD, PDGF-AA, las cinco isoformas, cuatro isoformas, tres isoformas o dos isoformas. En una realización, los aptámeros que se unen a PDGF incluyen una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 9 a SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 36 a SEC ID N°: 73, SEC ID N°: 85 y SEC ID N°: 77 a SEC ID N°: 81 y SEC ID N°: 86-90, 91, 93-95 y 102.
- 10 **[0089]** En una realización, la primera diana no estimula, tras la unión del aptámero, una respuesta inmunitaria, y además, la segunda diana estimula, tras la unión del aptámero, una respuesta inmunitaria. En una realización, la segunda diana es un receptor similar a toll. En otra realización, la segunda secuencia es una secuencia inmunoestimulante. En una realización, la secuencia inmunoestimulante es un motivo CpG.
- 15 **[0090]** En una realización, la primera secuencia puede unirse a una de las siguientes dianas: PDGF, IgE, IgE Fcε R1, PSMA, CD22, TNF-α, CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, FcRIIB, BTLA, TIM-3, CD11c, BAFF, B7-X, CD19, CD20, CD25 o CD33. En una realización, la primera secuencia puede unirse a PDGF.
- 20 **[0091]** La presente divulgación también proporciona composiciones que contienen un aptámero de unión a PDGF de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En realizaciones particulares de este aspecto de la divulgación, la composición comprende un aptámero de unión a PDGF seleccionado de ARC308, ARC404, ARC513, ARC592, ARC593, ARC594, ARC1472, ARC1473 y ARC1474.
- 25 **[0092]** En una realización, las composiciones de la divulgación incluyen un aptámero de unión a PDGF de la divulgación, un agente citotóxico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el agente citotóxico pertenece a una clase de agentes citotóxicos tales como estabilizadores de la tubulina, desestabilizadores de la tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN y agentes disruptores vasculares. En una realización, el agente citotóxico se usa solo o en combinaciones con uno o más agentes citotóxicos seleccionados del grupo que consiste en calicheamicina, doxorubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorubicina, docetaxel, irinotecan, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.
- 30 **[0093]** La divulgación también proporciona composiciones que incluyen un aptámero de unión a PDGF de la divulgación, un aptámero de unión a VEGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, estas composiciones también incluyen un agente citotóxico. Agentes citotóxicos adecuados incluyen agentes que pertenecen a una clase de agentes citotóxicos seleccionados del grupo que consiste en estabilizadores de la tubulina, desestabilizadores de la tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN y agentes disruptores vasculares. En una realización, el agente citotóxico se usa solo o en combinaciones de uno o más agentes citotóxicos seleccionados del grupo que consiste en calicheamicina, doxorubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorubicina, docetaxel, irinotecan, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.
- 35 **[0094]** La divulgación también proporciona procedimientos para tratar cáncer administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de unión a PDGF de la divulgación. La divulgación también proporciona procedimientos para tratar cáncer administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación.
- 40 **[0095]** En una realización, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor mediado por PDGF. En una realización, el cáncer o tumor mediado por PDGF es un glioblastoma, leucemia mielomonocítica crónica, un dermatofibrosarcoma protuberante, un tumor del estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejidos blandos.
- 45 **[0096]** En una realización, la composición incluye un agente citotóxico que pertenece a una clase de agentes citotóxicos seleccionados del grupo que consiste en estabilizadores de la tubulina, desestabilizadores de la tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN y agentes disruptores vasculares. En una realización, el agente citotóxico se usa solo o en combinaciones de uno o más agentes citotóxicos tales como calicheamicina, doxorubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorubicina, docetaxel, irinotecan, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.
- 50 **[0097]** La divulgación también proporciona procedimientos para inhibir el crecimiento de un tumor sólido administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de unión a PDGF de la divulgación. La divulgación también proporciona procedimientos para inhibir el crecimiento de un tumor sólido administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación.
- 55 **[0098]** En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de reducción del número de pericitos en un tumor que comprende tratar el tumor con un aptámero o composición de la divulgación. En una realización
- 60
- 65

particular, el aptámero se selecciona de ARC308, ARC404, ARC513, ARC592, ARC593, ARC594 y ARC1472 a ARC1474.

5 **[0099]** En una realización, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor mediado por PDGF. En una realización, el cáncer o tumor mediado por PDGF es un glioblastoma, leucemia mielomonocítica crónica, un dermatofibrosarcoma protuberante, un tumor del estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejidos blandos.

10 **[0100]** En una realización, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar un paciente que tiene un tumor, en el que el tumor no expresa un elevado nivel de VEGF, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de PDGF o composición de la divulgación al paciente. Los tumores que expresan bajos niveles de VEGF son conocidos en la bibliografía y se describen análogamente como débilmente accionados por VEGF. Uno de los modelos de tumor usados en la presente divulgación, el modelo de tumor de carcinoma pulmonar de Lewis, está débilmente accionado por VEGF. Tumores fuertemente accionados por VEGF, tales como el modelo RipTag2 usado para evaluar el aptámero de PDGF de la presente divulgación, expresan mayores niveles de VEGF. Las líneas celulares tumorales humanas usadas en estudios de xenoinjerto de ratón para perfilar la actividad de agentes anti-VEGF u otros agentes antiangiogénicos son conocidos en la bibliografía. Tales líneas celulares se derivan de tumores humanos de cerebro, colon, pulmón, mama, próstata y riñón, y se describen como más o menos dependientes de VEGF según nivel de expresión de VEGF. LS174T es un ejemplo de un tumor de xenoinjerto fuertemente accionado por VEGF. En una realización particular, el antagonista de PDGF es un aptámero anti-PDGF, particularmente un aptámero seleccionado del grupo que consiste en ARC308, ARC404, ARC513, ARC592, ARC593, ARC594 y ARC 1472 a ARC1474.

25 **[0101]** En una realización, la composición incluye un agente citotóxico que pertenece a una clase de agentes citotóxicos seleccionados de estabilizadores de la tubulina, desestabilizadores de la tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN y agentes disruptores vasculares. En una realización, el agente citotóxico se usa solo o en combinaciones de uno o más agentes citotóxicos tales como calicheamicina, doxorubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorubicina, docetaxel, irinotecan, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.

30 **[0102]** La divulgación también proporciona procedimientos de reducción de PLI en un tumor sólido administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de unión a PDGF de la divulgación. La divulgación también proporciona procedimientos de reducción de PLI en un tumor sólido administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación.

35 **[0103]** En una realización, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor mediado por PDGF. En una realización, el cáncer o tumor mediado por PDGF es un glioblastoma, leucemia mielomonocítica crónica, un dermatofibrosarcoma protuberante, un tumor del estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejidos blandos.

40 **[0104]** En una realización, la composición incluye un agente citotóxico que pertenece a una clase de agentes citotóxicos seleccionados del grupo que consiste en estabilizadores de la tubulina, desestabilizadores de la tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN y agentes disruptores vasculares. En una realización, el agente citotóxico se usa solo o en combinaciones de uno o más agentes citotóxicos tales como calicheamicina, doxorubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorubicina, docetaxel, irinotecan, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.

50 **[0105]** La divulgación también proporciona procedimientos para aumentar la permeabilidad de un tumor sólido a agentes citotóxicos administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de unión a PDGF de la divulgación. La divulgación también proporciona procedimientos para aumentar la permeabilidad de un tumor sólido a agentes citotóxicos administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación.

55 **[0106]** En una realización, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor mediado por PDGF. En una realización, el cáncer o tumor mediado por PDGF es un glioblastoma, leucemia mielomonocítica crónica, un dermatofibrosarcoma protuberante, un tumor del estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejidos blandos.

60 **[0107]** En una realización, la composición incluye un agente citotóxico que pertenece a una clase de agentes citotóxicos seleccionados del grupo que consiste en estabilizadores de la tubulina, desestabilizadores de la tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN y agentes disruptores vasculares. En una realización, el agente citotóxico se usa solo o en combinaciones de uno o más agentes citotóxicos tales como calicheamicina, doxorubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorubicina, docetaxel, irinotecan, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U. En una realización de la invención, la composición incluye un agente antiangiogénico que pertenece a la clase de agentes anti-VEGF seleccionados de fármacos antisentido de receptores RI y RII anti-VEGF o anti-VEGF, fármacos de ARNip de receptores RI y RII anti-VEGF o anti-VEGF, fármacos de aptámeros de receptores RI y RII anti-VEGF o anti-VEGF, fármacos basados en anticuerpos de receptores RI y RII anti-VEGF o anti-VEGF, fármacos basados en monocuerpos o adnectina de receptores RI y RII

anti-VEGF o anti-VEGF, o fármacos basados en proteínas quiméricas de receptores RI y RII anti-VEGF o anti-VEGF, fármacos derivados de antisentido anti-Ang2, anti-Ang1 o anti-Tie 1 o anti-Tie 2, ARNip, aptámero, anticuerpo, monocuerpo, adnectina o quimera de proteínas.

5 **[0108]** La divulgación también proporciona procedimientos de reducción de la expresión constitutiva del factor de crecimiento derivado de plaquetas en un tumor administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de unión a PDGF de la divulgación. La divulgación también proporciona procedimientos de reducción de la expresión constitutiva del factor de crecimiento derivado de plaquetas en un tumor administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación.

10 **[0109]** En una realización, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor mediado por PDGF. En una realización, el cáncer o tumor mediado por PDGF es un glioblastoma, leucemia mielomonocítica crónica, un dermatofibrosarcoma protuberante, un tumor del estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejidos blandos.

15 **[0110]** En una realización, la composición incluye un agente citotóxico que pertenece a una clase de agentes citotóxicos seleccionados del grupo que consiste en estabilizadores de la tubulina, desestabilizadores de la tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN y agentes disruptores vasculares. En una realización, el agente citotóxico se usa solo o en combinaciones de uno o más agentes citotóxicos tales como calicheamicina, doxorubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorubicina, docetaxel, irinotecan, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.

20 **[0111]** La divulgación también proporciona procedimientos de reducción de angiogénesis, neovascularización o tanto angiogénesis como neovascularización en un tumor administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de unión a PDGF de la divulgación. La divulgación también proporciona procedimientos de reducción de la angiogénesis, neovascularización o tanto angiogénesis como neovascularización en un tumor administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación. En una realización particular de la divulgación, el aptámero se administra de 1 a 28 días antes de administración de un agente dirigido anti-VEGF u otro agente anti-VEGF u otro agente anti-VEGF. En otra realización de la divulgación, el aptámero se administra simultáneamente con un agente anti-VEGF u otro agente anti-VEGF antiangiogénico. En otra realización de la divulgación, el aptámero de PDGF se administra de 1 a 14 días antes de la administración del agente antiangiogénico u otro agente anti-VEGF, otros agentes terapéuticos contra el cáncer conocidos, antes de tratamiento quirúrgico o cualquier otro procedimiento terapéutico o de diagnóstico (por ejemplo, radioterapia). En una realización particular de la divulgación, el agente anti-PDGF se administra durante hasta 14 días y luego se suspende mientras que se continúa la terapia anti-VEGF o antiangiogénica. En otra realización de la divulgación, el agente PDGF se administra de 1 a 28 días y el tamaño de la neovascularización del tumor, y el grado de crecimiento vascular tumoral, se monitoriza por microscopía intravital para guiar a un médico o enfermera en el momento adecuado de la administración del agente anti-VEGF, antiangiogénico o anti-VEGF. En otra realización de la divulgación, el aptámero de PDGF se administra 1-28 días para eliminar células de pericitos y murales productoras de VEGF del microentorno tumoral como un medio de alteración del nivel de VEGF de un tumor sólido.

35 **[0112]** En una realización, el cáncer o tumor es un cáncer o tumor mediado por PDGF. En una realización, el cáncer o tumor mediado por PDGF es un glioblastoma, leucemia mielomonocítica crónica, un dermatofibrosarcoma protuberante, un tumor del estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejidos blandos.

40 **[0113]** En una realización, la composición incluye un agente citotóxico que pertenece a una clase de agentes citotóxicos seleccionados del grupo que consiste en estabilizadores de la tubulina, desestabilizadores de la tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN y agentes disruptores vasculares. En una realización, el agente citotóxico se usa solo o en combinaciones de uno o más agentes citotóxicos tales como calicheamicina, doxorubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorubicina, docetaxel, irinotecan, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.

45 **[0114]** La divulgación también proporciona procedimientos para tratar un tumor mediado por PDGF, por ejemplo, un tumor sólido, en un sujeto que comprende administrar un aptámero de unión a PDGF de la divulgación al sujeto y tratar al sujeto con radioterapia. En algunas realizaciones, el aptámero de unión a PDGF de la divulgación aumenta el contenido de líquido edematoso del tumor, con respecto a un tumor sin tratar, antes de y/o durante radioterapia. En algunas realizaciones, el aptámero de unión a PDGF de la divulgación aumenta el contenido de oxígeno del tumor con respecto a un tumor sin tratar, antes de y/o durante radioterapia. En una realización particular, el aptámero específico para PDGF para su uso en radioterapia se selecciona del grupo que consiste en: ARC308, ARC404, ARC513, 592, 593, ARC594 y ARC1472 a ARC1474, particularmente del grupo que consiste en ARC308, ARC593 y ARC594. En una realización, el tumor que va a tratarse con el aptámero de la divulgación y radioterapia es un tumor colorrectal.

50 **[0115]** La divulgación también proporciona procedimientos de potenciamiento de la obtención de imágenes de tumores que comprenden administrar un aptámero de unión a PDGF y un fotosensibilizador a un sujeto que tiene un

tumor mediado por PDGF, activar el fotosensibilizador y detectar el tumor. En algunas realizaciones, el aptámero de unión a PDGF de la divulgación aumenta la cantidad de fotosensibilizador contenida en el tumor, con respecto a un tumor similar sin tratar con el aptámero de unión a PDGF de la divulgación. En algunas realizaciones, el aptámero de unión a PDGF y/o fotosensibilizador se administran perfundiendo el tumor con, o permitiendo que el tumor sea perfundido con, un líquido edematoso que comprende el aptámero de unión a PDGF y/o fotosensibilizador. En una realización particular, el aptámero específico para PDGF para su uso en la obtención de imágenes de tumores se selecciona del grupo que consiste en: ARC308, ARC404, ARC513, ARC592, ARC593, ARC594 y ARC1472 a ARC1474, particularmente del grupo que consiste en ARC308, ARC593 y ARC594. En una realización, el tumor que va a detectarse con el aptámero de la invención y el fotosensibilizador es un tumor colorrectal.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0116]** Los detalles de una o más realizaciones de la divulgación se exponen en la descripción adjunta a continuación. Ahora se describen los procedimientos preferidos y materiales. Otras características, objetos, y ventajas de la divulgación serán evidentes a partir de la descripción. En la memoria descriptiva, las formas singulares también incluyen el plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta divulgación. En el caso de conflicto, la presente memoria descriptiva dominará.

### EL PROCEDIMIENTO SELEX™

**[0117]** Un procedimiento adecuado para generar un aptámero es con el procedimiento titulado "Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial" ("Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment") ("SELEX™") generalmente representado en la Figura 3. El procedimiento SELEX™ es un procedimiento para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica a moléculas diana y se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 07/536.428 presentada el 11 de junio de 1990, ahora abandonada, la patente de EE.UU. nº 5.475.096 titulada "Ligandos de ácido nucleico" y la patente de EE.UU. nº 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813) titulada "Ligandos de ácido nucleico". Cada ligando de ácido nucleico identificado por SELEX™, es decir, cada aptámero, es un ligando específico de un compuesto o molécula diana dado. El procedimiento SELEX™ se basa en el único conocimiento de que los ácidos nucleicos tienen suficiente capacidad para formar una variedad de estructuras bi y tridimensionales y versatilidad química suficiente disponible dentro de sus monómeros para actuar de ligandos (es decir, forman pares de unión específica) con prácticamente cualquier compuesto químico, tanto monomérico como polimérico. Las moléculas de cualquier tamaño o composición pueden servir de dianas.

**[0118]** SELEX™ se basa como punto de partida en un gran biblioteca o conjunto de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden secuencias al azar. Los oligonucleótidos pueden ser ADN, ARN, o híbridos de ADN/ARN, modificados o sin modificar. En algunos ejemplos, el conjunto comprende el 100% de oligonucleótidos al azar o parcialmente al azar. En otros ejemplos, el conjunto comprende oligonucleótidos al azar o parcialmente al azar que contienen al menos una secuencia fija y/o secuencia conservada incorporada dentro de la secuencia al azar. En otros ejemplos, el conjunto comprende oligonucleótidos al azar o parcialmente al azar que contienen al menos una secuencia fija y/o conservada en su extremo 5' y/o 3' que puede comprender una secuencia compartida por todas las moléculas del conjunto de oligonucleótidos. Las secuencias fijas son secuencias comunes a oligonucleótidos en el conjunto que se incorpora para un fin preseleccionado, tal como motivos CpG descritos adicionalmente más adelante, sitios de hibridación para cebadores de PCR, secuencias promotoras para ARN polimerasas (por ejemplo, T3, T4, T7 y SP6), sitios de restricción, o secuencias homopoliméricas tales como trectos de poli A o poli T, núcleos catalíticos, sitios para la unión selectiva a columnas de afinidad, y otras secuencias para facilitar la clonación y/o secuenciación de un oligonucleótido de interés. Las secuencias conservadas son secuencias, distintas de las secuencias fijas previamente descritas, compartidas por varios aptámeros que se unen a la misma diana.

**[0119]** Los oligonucleótidos del conjunto incluyen preferentemente una porción de secuencia al azar, además de secuencias fijas necesarias para la eficiente amplificación. Normalmente, los oligonucleótidos del conjunto de partida contienen secuencias de los extremos 5' y 3' fijas que flanquean una región interna de 30-50 nucleótidos al azar. Los nucleótidos al azar pueden producirse de varias formas que incluyen síntesis química y selección de tamaño a partir de ácidos nucleicos celulares escindidos al azar. La variación de secuencias en ácidos nucleicos de prueba también puede introducirse o aumentarse por mutagénesis antes de o durante las iteraciones de selección/amplificación.

**[0120]** La porción de secuencia al azar del oligonucleótido puede ser de cualquier longitud y puede comprender ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos y pueden incluir nucleótidos modificados o no naturales o análogos de nucleótidos. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.958.691; la patente de EE.UU. nº 5.660.985; la patente de EE.UU. nº 5.958.691; la patente de EE.UU. nº 5.698.687; la patente de EE.UU. nº 5.817.635; la patente de EE.UU. nº 5.672.695 y la publicación PCT WO 92/07065. Los oligonucleótidos al azar pueden sintetizarse a partir de nucleótidos ligados a fosfodiéster usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos en

fase sólida muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Froehler y col., Nucl. Acid Res. 14:5399-5467 (1986) y Froehler y col., Tet. Lett. 27:5575-5578 (1986). Los oligonucleótidos al azar también puede sintetizarse usando procedimientos libres de disolución tales como los procedimientos de síntesis de triésteres. Véase, por ejemplo, Sood y col., Nucl. Acid Res. 4:2557 (1977) y Hirose y col., Tet. Lett., 28:2449 (1978). Las síntesis típicas llevadas a cabo en equipo de síntesis de ADN automatizado dan  $10^{14}$ - $10^{16}$  moléculas individuales, un número suficiente para la mayoría de los experimentos de SELEX™. Regiones suficientemente grandes de la secuencia al azar en el diseño de secuencias aumenta la probabilidad de que cada molécula sintetizada represente probablemente una única secuencia.

**[0121]** La biblioteca de partida de oligonucleótidos puede generarse por síntesis química automatizada en un sintetizador de ADN. Para sintetizar secuencias al azar, mezclas de cuatro nucleótidos se añaden a cada etapa de adición de nucleótidos durante el procedimiento de síntesis, permitiendo la incorporación al azar de los nucleótidos. Como se ha establecido anteriormente, en una realización, los oligonucleótidos al azar comprenden las secuencias al azar completas; sin embargo, en otras realizaciones, los oligonucleótidos al azar puede comprender extensiones de secuencias no al azar o parcialmente al azar. Las secuencias parcialmente al azar pueden crearse añadiendo los cuatro nucleótidos en diferentes relaciones molares en cada etapa de adición.

**[0122]** La biblioteca de partida de oligonucleótidos pueden ser tanto ARN como ADN, o ARN o ADN sustituido. En aquellos casos en los que vaya a usarse una biblioteca de ARN como biblioteca de partida, normalmente se genera sintetizando una biblioteca de ADN, opcionalmente amplificando por PCR, luego transcribiendo la biblioteca de ADN *in vitro* usando ARN polimerasa T7 o ARN polimerasas T7 modificadas, y purificando la biblioteca transcrita. Entonces, la biblioteca de ARN o ADN se mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión y se somete a iteraciones escalonadas de unión, separación y amplificación, usando el mismo esquema de selección general, para lograr prácticamente cualquier criterio deseado de afinidad y selectividad de unión. Más específicamente, empezando con una mezcla que contiene el conjunto de partida de ácidos nucleicos, el procedimiento SELEX™ incluye las etapas de: (a) poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión; (b) separar ácidos nucleicos sin unir de aquellos ácidos nucleicos que se han unido específicamente a moléculas diana; (c) disociar los complejos ácido nucleico-diana; (d) amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos ácido nucleico-diana para dar una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos; y (e) reiterar las etapas de unión, separación, disociación y amplificación a lo largo de tantos ciclos como se desee para dar ligandos de ácido nucleico altamente específicos de alta afinidad por la molécula diana. En aquellos casos en los que los aptámeros de ARN estén siendo seleccionados, el procedimiento SELEX™ comprende además las etapas de: (i) transcribir de forma inversa los ácidos nucleicos disociados de los complejos ácido nucleico-diana antes de la amplificación en la etapa (d); y (ii) transcribir los ácidos nucleicos amplificados de la etapa (d) antes de volver a empezar el procedimiento.

**[0123]** Dentro de una mezcla de ácidos nucleicos que contiene un gran número de posibles secuencias y estructuras hay un amplio intervalo de afinidades de unión por una diana dada. Una mezcla de ácidos nucleicos que comprende, por ejemplo, un segmento de 20 nucleótidos al azar puede tener  $4^{20}$  posibilidades de candidatos. Aquellas que tienen la mayor afinidad (menores constantes de disociación) por la diana son las que más probablemente se unan a la diana. Después de la separación, disociación y amplificación se genera una segunda mezcla de ácidos nucleicos, enriquecida en los candidatos de mayor afinidad de unión. Rondas adicionales de selección favorecen progresivamente los mejores ligandos hasta que la mezcla de ácidos nucleicos resultante esté predominantemente compuesta por sólo una o algunas secuencias. Entonces, ésta puede clonarse, secuenciarse y probarse individualmente para la afinidad de unión como ligandos o aptámeros puros.

**[0124]** Los ciclos de selección y amplificación se repiten hasta que se logre un objetivo deseado. En el caso más general, la selección/amplificación continúa hasta que no se logre mejora significativa en la fuerza de unión con la repetición del ciclo. El procedimiento se usa normalmente para muestrear aproximadamente  $10^{14}$  especies de ácidos nucleicos diferentes, pero puede usarse para muestrear nada menos que aproximadamente  $10^{18}$  especies de ácidos nucleicos diferentes. Generalmente, las moléculas de aptámero de ácido nucleico se seleccionan en un procedimiento de 5 a 20 ciclos. En una realización, la heterogeneidad sólo se introduce en las etapas de selección iniciales y no se produce en todo el procedimiento de replicación.

**[0125]** En una realización de SELEX™, el procedimiento de selección es tan eficiente en el aislamiento de aquellos ligandos de ácido nucleico que se unen más fuertemente a la diana seleccionada que sólo se requiere un ciclo de selección y amplificación. Una selección eficiente tal puede producirse, por ejemplo, en un procedimiento de tipo cromatográfico en el que la capacidad de los ácidos nucleicos para asociarse con dianas unidas sobre una columna opera de tal forma que la columna puede permitir suficientemente la separación y aislamiento de los ligandos de ácido nucleico de mayor afinidad.

**[0126]** En muchos casos no es necesariamente deseable realizar las etapas iterativas de SELEX™ hasta que se identifique un ligando de un único ácido nucleico. La disolución de ligandos de ácido nucleico específicos para diana puede incluir una familia de estructuras de ácido nucleico o motivos que tienen varias secuencias conservadas y varias secuencias que pueden estar sustituidas o añadidas sin afectar significativamente la afinidad de los ligandos de ácido nucleico por la diana. Terminando el procedimiento SELEX™ antes de completarse es posible determinar la secuencia de varios miembros de la familia de la disolución de ligandos de ácidos nucleico.

**[0127]** Se sabe que existe una variedad de estructuras primarias, secundarias y terciarias de ácido nucleico. Las estructuras o motivos que se han mostrado que están más comúnmente implicadas en interacciones de tipo no Watson-Crick se denominan en lo sucesivo bucles en horquilla, protuberancias simétricas y asimétricas, pseudonudos y combinaciones de miríadas de los mismos. Casi todos los casos conocidos de tales motivos sugieren que pueden formarse en una secuencia de ácidos nucleicos de no más de 30 nucleótidos. Por este motivo, frecuentemente se prefiere que los procedimientos SELEX™ con segmentos al azar contiguos se inicien con secuencias de ácidos nucleicos que contienen un segmento al azar de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 nucleótidos, y de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 nucleótidos en algunas realizaciones. En un ejemplo, la secuencia fija en 5':al azar:fija en 3' comprende una secuencia al azar de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 nucleótidos.

**[0128]** El procedimiento SELEX™ central se ha modificado para lograr varios objetivos específicos. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.707.796 describe el uso de SELEX™ conjuntamente con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas tales como ADN curvado. La patente de EE.UU. nº 5.763.177 describe procedimientos basados en SELEX™ para seleccionar ligandos de ácido nucleico que contienen grupos fotorreactivos que pueden unirse y/o fotorreticularse con y/o fotoinactivar una molécula diana. La patente de EE.UU. nº 5.567.588 y la patente de EE.UU. nº 5.861.254 describen procedimientos basados en SELEX™ que consiguen una separación altamente eficiente entre oligonucleótidos que tienen alta y baja afinidad por una molécula diana. La patente de EE.UU. nº 5.496.938 describe procedimientos para obtener ligandos de ácido nucleico mejorados después se realizase el procedimiento SELEX™. La patente de EE.UU. nº 5.705.337 describe procedimientos para ligar covalentemente un ligando a su diana.

**[0129]** SELEX™ también puede usarse para obtener ligandos de ácido nucleico que se unen a más de un sitio en la molécula diana, y para obtener ligandos de ácido nucleico que incluyen especies de no ácido nucleico que se unen a sitios específicos en la diana. SELEX™ proporciona medios para aislar e identificar ligandos de ácido nucleico que se unen a cualquier diana prevista, que incluye, biomoléculas grandes y pequeñas tales como proteínas de unión a ácido nucleico y proteínas que no se unen a ácidos nucleicos como parte de su función biológica, además de cofactores y otras moléculas pequeñas. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.580.737 desvela secuencias de ácidos nucleicos identificadas por SELEX™ que pueden unirse con alta afinidad a cafeína y al análogo estrechamente relacionado, la teofilina.

**[0130]** Counter-SELEX™ es un procedimiento para mejorar la especificidad de ligandos de ácido nucleico por una molécula diana eliminando secuencias de ligando de ácido nucleico con reactividad cruzada por una o más moléculas no diana. Counter-SELEX™ comprende las etapas de: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen una afinidad elevada por la diana con respecto a la mezcla candidata pueden separarse del resto de la mezcla candidata; (c) separar los ácidos nucleicos con elevada afinidad del resto de la mezcla candidata; (d) disociar los ácidos nucleicos con elevada afinidad de la diana; (e) poner en contacto los ácidos nucleicos con elevada afinidad con una o más moléculas no diana de forma que se eliminen los ligandos de ácido nucleico con especificidad específica por la(s) molécula(s) no diana; y (f) amplificar los ácidos nucleicos con especificidad específica sólo por la molécula diana para dar una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácidos nucleicos con una afinidad y especificidad relativamente mayor por la unión a la molécula diana. Como se ha descrito anteriormente para SELEX™, los ciclos de selección y amplificación se repiten según sea necesario hasta que se logre un objetivo deseado.

**[0131]** Un posible problema encontrado en el uso de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos y vacunas es que los oligonucleótidos en su forma de fosfodiéster pueden ser degradados rápidamente en fluidos corporales por enzimas intracelulares y extracelulares tales como endonucleasas y exonucleasas antes de manifestarse el efecto deseado. Por tanto, el procedimiento SELEX™ engloba la identificación de ligandos de ácido nucleico de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas al ligando tales como estabilidad *in vivo* mejorada o características de administración mejoradas. Ejemplos de tales modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de azúcar y/o fosfato y/o base. Los ligandos de ácido nucleico identificados por SELEX™ que contienen nucleótidos modificados se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.660.985, que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos químicamente modificados en la posición 2' de ribosa, posición 5 de pirimidinas y posición 8 de purinas, la patente de EE.UU. nº 5.756.703 que describe oligonucleótidos que contienen diversas pirimidinas modificadas en 2', y la patente de EE.UU. nº 5.580.737 que describe ligandos de ácido nucleico altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con sustituyentes 2'-amino (2'-NH<sub>2</sub>), 2'-flúor (2'-F) y/o 2'-OMe.

**[0132]** Las modificaciones de los ligandos de ácido nucleico contempladas en esta divulgación incluyen, pero no se limitan a, aquellas que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, hidrofobia, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y fluxionalidad con las bases de los ligandos de ácido nucleico o con el ligando de ácido nucleico como un todo. Las modificaciones para generar poblaciones de oligonucleótidos que son resistentes a nucleasas también pueden incluir uno o más enlaces internucleotídicos sustitutos, azúcares alterados, bases alteradas, o combinaciones de los mismos. Tales modificaciones incluyen, pero

no se limitan a, modificaciones en el azúcar en la posición 2', modificaciones en la pirimidina en la posición 5, modificaciones en la purina en la posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo, modificaciones en el esqueleto, modificaciones en fosforotioato o fosfato de alquilo, metilaciones, y combinaciones de apareamientos de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina. Las modificaciones también puede incluir modificaciones en 3' y 5' tales como taponamiento.

**[0133]** En una realización se proporcionan oligonucleótidos en los que el grupo P(O)O está sustituido por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("dilitoato"), P(O)NR<sub>2</sub> ("amidita"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> ("formacetal") o 3'-amina (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) en las que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o sin sustituir. Los grupos de enlace pueden unirse a nucleótidos adyacentes mediante un enlace -O-, -N- o -S-. No se requiere que todos los enlaces en el oligonucleótido sean idénticos. Como se usa en este documento, el término fosforotioato engloba uno o más átomos de oxígeno que no forman puentes en un enlace fosfodiéster sustituido por uno o más átomos de azufre.

**[0134]** En otras realizaciones, los oligonucleótidos comprenden grupos azúcar modificados, por ejemplo, uno o más de los grupos hidroxilo se reemplaza por halógeno, grupos alifáticos, o funcionalizados como éteres o aminas. En una realización, la posición 2' del residuo de furanosa está sustituida por cualquiera de un grupo O-metilo, O-alquilo, O-alilo, S-alquilo, S-alilo o halo. Los procedimientos de síntesis de azúcares modificados en 2' se describen, por ejemplo, en Sproat y col., Nucl. Acid Res. 19:733-738 (1991); Cotten y col., Nucl. Acid Res. 19:2629-2635 (1991); y Hobbs y col., Biochemistry 12:5138-5145 (1973). Otras modificaciones son conocidas para un experto en la materia. Tales modificaciones pueden ser modificaciones del procedimiento pre-SELEX™ o modificaciones del procedimiento pos-SELEX™ (modificación de ligandos sin modificar previamente identificados), o puede hacerse por incorporación en el procedimiento SELEX™.

**[0135]** Las modificaciones del procedimiento pre-SELEX™ o aquellas hechas por incorporación en el procedimiento SELEX dan ligandos de ácido nucleico con tanto especificidad por su diana SELEX™ como estabilidad mejorada, por ejemplo, estabilidad *in vivo*. Las modificaciones del procedimiento pos-SELEX™ hechas a ligandos de ácido nucleico pueden producir estabilidad mejorada, por ejemplo, estabilidad *in vivo* sin afectar adversamente la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico.

**[0136]** El procedimiento SELEX™ engloba combinar oligonucleótidos seleccionados con otros oligonucleótidos seleccionados y unidades funcionales de no oligonucleótido como se describen en la patente de EE.UU. n° 5.637.459 y la patente de EE.UU. n° 5.683.867. El procedimiento SELEX™ engloba adicionalmente combinar ligandos de ácido nucleico seleccionados con compuestos lipófilos o no inmunogénicos de alto peso molecular en un complejo de diagnóstico o terapéutico como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6.011.020, la patente de EE.UU. n° 6.051.698 y la publicación PCT n° WO 98/18480. Estas patentes y solicitudes enseñan la combinación de una amplia matriz de formas y otras propiedades, con las propiedades de amplificación y replicación eficientes de oligonucleótidos, y con las propiedades deseables de otras moléculas.

**[0137]** También se ha explorado la identificación de ligandos de ácido nucleico para péptidos flexibles pequeños mediante el procedimiento SELEX™. Los péptidos pequeños tienen estructuras flexibles y normalmente existen en disolución en un equilibrio de múltiples conformeros, y por tanto, se pensó inicialmente que las afinidades de unión podrían limitarse por la entropía conformacional perdida tras la unión al péptido flexible. Sin embargo, la viabilidad de la identificación de ligandos de ácido nucleico para péptidos pequeños en disolución se demostró en la patente de EE.UU. n° 5.648.214 en la que se identificaron ligandos de ácido nucleico de ARN de alta afinidad por la sustancia P, un péptido de 11 aminoácidos.

**[0138]** El aptámero con especificidad y afinidad de unión por la(s) diana(s) de la presente divulgación se selecciona normalmente por el procedimiento SELEX™ como se describe en este documento. Entonces, como parte del procedimiento SELEX™, las secuencias seleccionadas que van a unirse a la diana se minimizan opcionalmente para determinar la secuencia mínima que tiene la afinidad de unión deseada. Las secuencias de aptámeros seleccionadas y/o las secuencias de aptámeros minimizadas se optimizan opcionalmente realizando mutagénesis al azar o dirigida de la secuencia para aumentar la afinidad de unión o alternativamente para determinar qué posiciones en la secuencia son esenciales para la actividad de unión. Por ejemplo, una "reselección dopada" puede usarse para explorar los requisitos de secuencia dentro de un aptámero. Durante la reselección dopada, las selecciones se llevan a cabo con un conjunto degenerado sintético que se ha diseñado basándose en una única secuencia. El nivel de degeneración normalmente varía del 70% al 85% de nucleótido natural. En general se observan mutaciones neutras tras la reselección dopada, pero en algunos casos los cambios de secuencia pueden producir mejoras en la afinidad. Adicionalmente, las selecciones pueden realizarse con secuencias que incorporan secuencias modificadas para estabilizar las moléculas de aptámero contra la degradación *in vivo*.

#### SELEX™ MODIFICADO EN 2'

**[0139]** Para que un aptámero sea adecuado para su uso como un agente terapéutico, es preferentemente barato de sintetizar, seguro y estable *in vivo*. Aptámeros de ARN y ADN natural son normalmente no estables *in vivo* debido a su susceptibilidad a la degradación por nucleasas. La resistencia a la degradación por nucleasas puede aumentarse enormemente, si se desea, por incorporación de grupos modificadores en la posición 2'.

**[0140]** Los grupos 2'-flúor y 2'-amino se han incorporado satisfactoriamente en bibliotecas de oligonucleótidos de las que posteriormente se han seleccionado aptámeros. Sin embargo, estas modificaciones aumentan enormemente el coste de síntesis del aptámero resultante y pueden introducir asuntos de seguridad en algunos casos debido a la posibilidad de que los nucleótidos modificados pudieran recircularse en ADN huésped por degradación de los oligonucleótidos modificados y posterior uso de los nucleótidos como sustratos para la síntesis de ADN.

**[0141]** Los aptámeros que contienen 2'-O-metil-nucleótidos ("2'-OMe"), como se proporciona en algunas realizaciones en este documento, vencen muchos de estos inconvenientes. Los oligonucleótidos que contienen 2'-OMe-nucleótidos son resistentes a nucleasa y baratos de sintetizar. Aunque los 2'-OMe-nucleótidos son ubicuos en sistemas biológicos, las polimerasas naturales no aceptan 2'-OMe-NTP como sustratos bajo condiciones fisiológicas, por tanto, no hay problemas de seguridad con respecto a la recirculación de 2'-OMe-nucleótidos en ADN huésped. Los procedimientos SELEX™ usados para generar aptámeros modificados con 2' se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº de serie 60/430.761 presentada el 3 de diciembre de 2002, la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº de serie 60/487.474 presentada el 15 de julio de 2003, la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº de serie 60/517.039 presentada el 4 de noviembre de 2003, la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/729.581 presentada el 3 de diciembre de 2003, la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/873.856 presentada el 21 de junio de 2004 titulada "Procedimiento para la selección *in vitro* de ácidos nucleicos sustituidos con 2'-OMe" y la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº de serie 60/696.295 presentada el 30 de junio de 2005 titulada "Materiales y procedimientos mejorados para la generación de transcritos de ácido nucleico que contienen completamente modificados en 2'".

**[0142]** La presente divulgación incluye aptámeros que se unen a y modulan la función de PDGF que contienen nucleótidos modificados (por ejemplo, nucleótidos que tienen una modificación en la posición 2') para hacer el oligonucleótido más estable que el oligonucleótido sin modificar a la degradación enzimática y química, además de degradación térmica y física. Aunque hay varios ejemplos de aptámeros que contienen 2'-OMe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Ruckman y col., J.Biol.Chem., (1998) 273, 20556-20567-695), éstos se generaron por la selección *in vitro* de bibliotecas de transcritos modificados en los que los residuos C y U estaban sustituidos con 2'-flúor (2'-F) y los residuos A y G con 2'-OH. Entonces, una vez se identificaron secuencias funcionales, cada residuo A y G se probó para la tolerancia a la sustitución con 2'-OMe, y el aptámero se volvió a sintetizar teniendo todos los residuos A y G que toleraban la sustitución con 2'-OMe como residuos 2'-OMe. La mayoría de los residuos A y G de aptámeros generados en este modo de dos etapas toleran la sustitución con residuos 2'-OMe aunque, en promedio, aproximadamente el 20% no la toleraban. Por consiguiente, los aptámeros generados usando este procedimiento tienden a contener de dos a cuatro residuos 2'-OH, y como resultado hay un equilibrio entre la estabilidad y el coste de síntesis. Incorporando nucleótidos modificados en la reacción de transcripción que genera oligonucleótidos estabilizados usados en bibliotecas de oligonucleótidos de las que se seleccionan los aptámeros y se enriquecen por SELEX™ (y/o cualquiera de sus variaciones y mejoras, que incluyen aquellas descritas en este documento), los procedimientos de la presente divulgación eliminan la necesidad de estabilizar los oligonucleótidos de aptámeros seleccionados (por ejemplo, volviendo a sintetizar los oligonucleótidos de aptámeros con nucleótidos modificados).

**[0143]** En una realización, la presente divulgación proporciona aptámeros que comprenden combinaciones de modificaciones con 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi y 2'-OMe de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP. En otra realización, la presente divulgación proporciona aptámeros que comprenden combinaciones de modificaciones con 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH<sub>2</sub> y 2'-metoxietilo de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP. En otra realización, la presente divulgación proporciona aptámeros que comprenden 56 combinaciones de modificaciones con 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH<sub>2</sub> y 2'-metoxietilo de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP.

**[0144]** Los aptámeros modificados en 2' de algunas realizaciones de la divulgación se crean usando polimerasas modificadas, por ejemplo, una polimerasa T7 modificada que tiene una tasa de incorporación de nucleótidos modificados que tienen sustituyentes voluminosos en la posición 2' de furanosa que es superior a la de polimerasas naturales. Por ejemplo, una polimerasa T7 mutante (Y639F) en la que el residuo de tirosina en la posición 639 se ha cambiado por fenilalanina utiliza fácilmente 2'-desoxi-, 2'-amino- y 2'-fluoro-nucleótidos trifosfato (NTP) como sustratos y se ha usado ampliamente para sintetizar ARN modificados para una variedad de aplicaciones. Sin embargo, esta polimerasa T7 mutante según se informa no puede utilizar fácilmente (es decir, incorporar) NTP con sustituyentes en 2' voluminosos tales como los sustituyentes 2'-OMe o 2'-azido (2'-N<sub>3</sub>). Para la incorporación de sustituyentes en 2' voluminosos, un mutante de la polimerasa T7 (Y639F/H784A) que tiene la histidina en la posición 784 se cambió a un residuo de alanina, además de la mutación Y639F que se ha descrito y se ha usado en circunstancias limitadas para incorporar NTP de pirimidina modificados. Véase Padilla, R. y Sousa, R., Nucleic Acids Res., 2002, 30(24): 138. Se ha usado una ARN polimerasa T7 mutante Y639F/H784A/K378R en circunstancias limitadas para incorporar NTP de purina y pirimidina modificados, por ejemplo, 2'-OMe-NPT, pero requiere una adición de 2'-OH-GTP para la transcripción. Véase Burmeister y col., Chemistry and Biology, 2005, 12: 25-33. También se ha descrito una polimerasa T7 mutante (H784A) que tiene la histidina en la posición 784 que se cambió a un residuo de alanina. Padilla y col., Nucleic Acids Research, 2002, 30: 138. En tanto las polimerasas mutantes Y639F/H784A como las T7 mutantes H784A el cambio a un residuo de aminoácido más pequeño tal como

alanina permite la incorporación de sustratos de nucleótidos más voluminosos, por ejemplo, nucleótidos sustituidos con 2'-O-metilo. Véase Chelliserry, K. y Ellington, A.D., Nature Biotech, 2004, 9:1155-60. Se han descrito ARN polimerasas T7 adicionales con mutaciones en el sitio activo de la ARN polimerasa T7 que incorporan más fácilmente los sustratos modificados en 2' voluminosos, por ejemplo, una ARN polimerasa mutante T7 que tiene el residuo de tirosina en la posición 639 cambiado por una leucina (Y639L). Sin embargo, la actividad se sacrifica frecuentemente para aumentar la especificidad por sustrato conferida por tales mutaciones, conduciendo a bajos rendimientos de transcritos. Véase Padilla R y Sousa, R., Nucleic Acids Re., 1999, 27(6): 15G1.

**[0145]** Generalmente se ha encontrado que en las condiciones desveladas en este documento el mutante Y639F puede usarse para la incorporación de todos los NTP sustituidos con 2'-OMe, excepto GTP, y las ARN polimerasas T7 mutantes Y639F/H784A, Y639F/H784A/K378R, Y639L/H784A y Y639L/H784A/K378R pueden usarse para la incorporación de todos los NTP sustituidos con 2'-OMe incluyendo GTP. Se espera que el mutante H784A posea propiedades similares a las de los mutantes Y639F y Y639F/H784A cuando se usan en las condiciones desveladas en este documento.

**[0146]** Los oligonucleótidos modificados en 2' pueden sintetizarse completamente por nucleótidos modificados, o con un subconjunto de nucleótidos modificados. Todos los nucleótidos pueden modificarse, y todos pueden contener la misma modificación. Todos los nucleótidos pueden modificarse, pero contienen diferentes modificaciones, por ejemplo, todos los nucleótidos que contienen la misma base pueden tener un tipo de modificación, mientras que los nucleótidos que contienen otras bases pueden tener tipos diferentes de modificación. Todos los nucleótidos de purina pueden tener un tipo de modificación (o están sin modificar), mientras que todos los nucleótidos de pirimidina tienen otro tipo de modificación diferente (o están sin modificar). De esta forma, los transcritos, o bibliotecas de transcritos, se generan usando cualquier combinación de modificaciones que incluye, por ejemplo, ribonucleótidos (2'-OH), desoxirribonucleótidos (2'-desoxi), nucleótidos 2'-F y 2'-OMe. Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-C y -U y 2'-OH-A y -G se denomina en lo sucesivo una mezcla "rRmY" y aptámeros seleccionados de la misma se denominan en lo sucesivo aptámeros "rRmY". Una mezcla de transcripción que contiene desoxi-A y -G y 2'-OMe-U y -C se denomina en lo sucesivo una mezcla "dRmY" y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan en lo sucesivo aptámeros "dRmY". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, -C y -U y 2'-OH-G se denomina en lo sucesivo una mezcla "rGmH" y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan en lo sucesivo aptámeros "rGmH". Una mezcla de transcripción que contiene alternativamente 2'-OMe-A, -C, -U y -G y 2'-OMe-A, -U y -C y 2'-F-G se denomina en lo sucesivo una "mezcla alternante" y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan en lo sucesivo aptámeros de la "mezcla alternante". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, -U, -C y -G en la que hasta el 10% de las G son ribonucleótidos se denomina en lo sucesivo una mezcla "r/mGmH" y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan en lo sucesivo aptámeros "r/mGmH". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, -U y -C y 2'-F-G se denomina en lo sucesivo una mezcla "fGmH" y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan en lo sucesivo aptámeros "fGmH". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OH-A y -G y 2'-F-C y -U se denomina en lo sucesivo una mezcla "rRfY" y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan en lo sucesivo aptámeros "rRfY". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, -U y -C y desoxi-G se denomina en lo sucesivo una mezcla "dGmH" y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan en lo sucesivo aptámeros "dGmH". Una mezcla de transcripción que contiene desoxi-A y 2'-OMe-C, -G y -U se denomina en lo sucesivo una mezcla "dAmB" y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan en lo sucesivo aptámeros "dAmB", y una mezcla de transcripción que contiene todos los 2'-OH-nucleótidos se denomina en lo sucesivo una mezcla "rN" y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan en lo sucesivo aptámeros "rN", "rRy" o "ARN". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OH-adenosina trifosfato y guanosina trifosfato y desoxi-citidina trifosfato y timidina trifosfato se denomina en lo sucesivo una mezcla rRdY y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan en lo sucesivo aptámeros "rRdY". Un aptámero "mRmY" es uno que sólo contiene 2'-OMe-nucleótidos, excepto el nucleótido de partida que es 2'-hidroxi.

**[0147]** Una realización preferida incluye cualquier combinación de 2'-OH-, 2'-desoxi- y 2'-OMe-nucleótidos. Otra realización incluye cualquier combinación de 2'-desoxi- y 2'-OMe-nucleótidos. Todavía otra realización incluye cualquier combinación de 2'-desoxi- y 2'-OMe-nucleótidos en la que las pirimidinas son 2'-OMe (tal como dRmY, mRmY o dGmH).

**[0148]** La incorporación de nucleótidos modificados en los aptámeros de la divulgación puede llevarse a cabo antes (pre-) del procedimiento de selección (por ejemplo, una modificación del procedimiento pre-SELEX™). Opcionalmente, los aptámeros de la divulgación en los que los nucleótidos modificados se han incorporado por la modificación del procedimiento pre-SELEX™ pueden modificarse adicionalmente por un procedimiento de modificación pos-SELEX™ (es decir, una modificación del procedimiento pos-SELEX™ después de una modificación pre-SELEX™). Las modificaciones del procedimiento pre-SELEX™ dan ligandos de ácido nucleico modificados con especificidad por la diana SELEX™ y también mejora la estabilidad *in vivo*. Las modificaciones del procedimiento pos-SELEX™, es decir, la modificación (por ejemplo, truncación, delección, sustitución o modificaciones de nucleótidos adicionales de ligandos previamente identificados que tienen nucleótidos incorporados por modificación del procedimiento pre-SELEX™) puede producir una mejora adicional de la estabilidad *in vivo* sin afectar adversamente la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico que tiene nucleótidos incorporados por modificación del procedimiento pre-SELEX™.

**[0149]** Para generar conjuntos de transcritos de ARN modificados en 2' (por ejemplo, 2'-OMe) en condiciones bajo las que una polimerasa acepta los NTP modificados en 2' pueden usarse las ARN polimerasas T7 mutantes Y693F, Y693F/ K378R, Y693F/H784A, Y693F/H784A/K378R, Y693L/H784A, Y693L/H784A/K378R, Y639L o Y639L/K378R. Una polimerasa preferida es la ARN polimerasa T7 mutante Y639L/H784A. Otra polimerasa preferida es la ARN polimerasa T7 mutante Y639L/H784A/K378R. En la presente divulgación también pueden usarse otras ARN polimerasas T7, particularmente aquellas que presentan una alta tolerancia por sustituyentes en 2' voluminosos. Si se usan en una polimerización dirigida a molde usando las condiciones desveladas en este documento, la ARN polimerasa T7 mutante Y639L/H784A o Y639L/H784A/K378R puede usarse para la incorporación de todos los 2'-OMe-NTP, incluyendo GTP, con mayores rendimientos de transcritos que los conseguidos usando las ARN polimerasa T7 mutantes Y639F, Y639F/K378R, Y639F/H784A, Y639F/H784A/K378R, Y639L o Y639L/K378R. Si se usan bajo las condiciones de transcripción de SELEX™ modificadas en 2' desveladas en este documento, las ARN polimerasa T7 mutantes Y639L/H784A y Y639L/H784A/K378R no requieren 2'-OH-GTP para lograr altos rendimientos de oligonucleótidos modificados en 2', por ejemplo, que contienen 2'-OMe.

**[0150]** Se ha determinado que varios factores son importantes para las condiciones de transcripción útiles en los procedimientos desvelados en este documento. Por ejemplo, los aumentos en los rendimientos de transcrito modificado se observan cuando una secuencia conductora se incorpora en el extremo 5' del molde de transcripción de ADN. La secuencia conductora tiene normalmente 6-15 nucleótidos de longitud, y puede estar compuesta por todas las purinas, o una mezcla de nucleótidos de purina y pirimidina.

**[0151]** La transcripción puede dividirse en dos fases: la primera fase es la iniciación, durante la que un NTP se añade al extremo hidroxilo en 3' de GTP (u otra guanosina sustituida) para dar un dinucleótido que luego se extiende aproximadamente 10-12 nucleótidos; la segunda fase es la elongación, durante la que la transcripción avanza más allá de la adición de los primeros aproximadamente 10-12 nucleótidos. Se ha encontrado que pequeñas cantidades de 2'-OH-GTP añadidas a una mezcla de transcripción que contiene un exceso de 2'-OMe-GTP son suficientes para permitir que la polimerasa inicie la transcripción usando 2'-OH-GTP, pero una vez la transcripción entra en la fase de elongación, la discriminación reducida entre 2'-OMe- y 2'-OH-GTP, y el exceso de 2'-OMe-GTP con respecto a 2'-OH-GTP, permite la incorporación de principalmente el 2'-OMe-GTP.

**[0152]** Otro factor importante en la incorporación de nucleótidos sustituidos con 2'-OMe en transcritos es el uso de tanto magnesio como manganeso divalente en la mezcla de transcripción. Se ha encontrado que diferentes combinaciones de concentraciones de cloruro de magnesio y cloruro de manganeso afectan el rendimiento de los transcritos 2'-O-metilados, dependiendo la concentración óptima del cloruro de magnesio y de manganeso de la concentración en la mezcla de reacción de transcripción de NTP que complejan iones metálicos divalentes. Para obtener el mayor rendimiento de transcritos máximamente 2'-O-metilados (es decir, todos los 2'-OMe-A, -C y -U y aproximadamente el 90% de los nucleótidos G) se prefieren concentraciones de aproximadamente cloruro de magnesio 5 mM y cloruro de manganeso 1,5 mM cuando cada NTP está presente a una concentración de 0,5 mM. Si la concentración de cada NTP es 1,0 mM se prefieren concentraciones de aproximadamente cloruro de magnesio 6,5 mM y cloruro de manganeso 2,0 mM. Si la concentración de cada NTP es 2,0 mM se prefieren concentraciones de aproximadamente cloruro de magnesio 9,5 mM y cloruro de manganeso 3,0 mM. En cualquier caso, las desviaciones de estas concentraciones de hasta dos veces todavía dan cantidades significativas de transcritos modificados.

**[0153]** También es importante la transcripción por cebado con GMP o guanosina, u otro no 2'-OMe-no trifosfato. Este efecto resulta de la especificidad de la polimerasa por el nucleótido de iniciación. Como resultado, es probable que el nucleótido del extremo 5' de cualquier transcrito generado de este modo sea 2'-OH-G. La concentración preferida de GMP (o guanosina) es 0,5 mM e incluso más preferentemente 1 mM. También se ha descubierto que incluir PEG, preferentemente PEG-8000, en la reacción de transcripción es útil para maximizar la incorporación de nucleótidos modificados.

**[0154]** Para la máxima incorporación de 2'-OMe-ATP (100%), -UTP (100%), -CTP (100%) y -GTP (~90%) ("r/mGmH") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (peso/volumen), Triton X-100 0,01% (peso/volumen), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (6,5 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 1,0 mM), MnCl<sub>2</sub> 1,5 mM (2,0 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 1,0 mM), 2'-OMe-NTP (cada uno) 500 μM (más preferentemente 1,0 mM), 2'-OH-GTP 30 μM, 2'-OH-GMP 500 μM, pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F/H784A 200 nM, unidades de pirofosfatasa inorgánica/ml y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud. Como se usa en este documento, una unidad de la ARN polimerasa T7 mutante Y639F/H784A (o cualquier otra ARN polimerasa T7 mutante especificada en este documento) se define como la cantidad de enzima requerida para incorporar 1 nmol de 2'-OMe-NTP en transcritos bajo las condiciones de r/mGmH. Como se usa en este documento, una unidad de pirofosfatasa inorgánica se define como la cantidad de enzima que liberará 1,0 mol de ortofosfato inorgánico por minuto a pH 7,2 y 25°C.

**[0155]** Para la incorporación máxima (100%) de 2'-OMe-ATP, -UTP y -CTP ("rGmH") en transcritos se

5 prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (peso/volumen), Triton X-100 0,01% (peso/volumen), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (9,5 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 2,0 mM), MnCl<sub>2</sub> 1,5 mM (3,0 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 2,0 mM), 2'-OMe-NTP (cada uno) 500 μM (más preferentemente 2,0 mM), pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F 200 nM, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml, y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud.

10 **[0156]** Para la incorporación máxima de 2'-OMe-ATP (100%), 2'-OMe-UTP (100%), 2'-OMe-CTP (100%) y 2'-OMe-GTP (100%) ("mRmY") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (peso/volumen), Triton X-100 0,01% (peso/volumen), MgCl<sub>2</sub> 8 mM, MnCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 2'-OMe-NTP (cada uno) 1,5 mM, 2'-OH-GMP 1 mM, pH 7,5, ARN polimerasa T7 mutante Y639L/H784A/K378R 200 nM, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia conductora que aumenta el rendimiento de transcripción bajo las condiciones de transcripción derivadas. En una realización, la secuencia conductora es una secuencia conductora de todas las purinas. En otra realización, la secuencia conductora es una mezcla de purinas y pirimidinas. Como se usa en este documento, una unidad de pirofosfatasa inorgánica se define como la cantidad de enzima que liberará 1,0 mol de ortofosfato inorgánico por minuto a pH 7,2 y 25°C.

20 **[0157]** Para la incorporación máxima (100%) de 2'-OMe-UTP y -CTP ("rRmY") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (peso/volumen), Triton X-100 0,01% (peso/volumen), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (9,5 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 2,0 mM), MnCl<sub>2</sub> 1,5 mM (3,0 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 2,0 mM), 2'-OMe-NTP (cada uno) 500 μM (más preferentemente 2,0 mM), pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F/H784A 200 nM, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud.

25 **[0158]** Para la incorporación máxima (100%) de desoxi-ATP y -GTP y 2'-OMe-UTP y -CTP ("dRmY") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (peso/volumen), Triton X-100 0,01% (peso/volumen), MgCl<sub>2</sub> 9,5 mM, MnCl<sub>2</sub> 3,0 mM, 2'-OMe-NTP (cada uno) 2,0 mM, pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F 200 nM, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud.

30 **[0159]** Para la incorporación máxima (100%) de 2'-OMe-ATP, -UTP y -CTP y 2'-F-GTP ("fGmH") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (peso/volumen), Triton X-100 0,01 % (peso/volumen), MgCl<sub>2</sub> 9,5 mM, MnCl<sub>2</sub> 3,0 mM, 2'-OMe-NTP (cada uno) 2,0 mM, pH 7,5, ARN Polimerasa T7 Y639F 200 nM, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud.

35 **[0160]** Para la incorporación máxima (100%) de desoxi-ATP y 2'-OMe-UTP, -GTP y -CTP ("dAmB") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10% (peso/volumen), Triton X-100 0,01 % (peso/volumen), MgCl<sub>2</sub> 9,5 mM, MnCl<sub>2</sub> 3,0 mM, 2'-OMe-NTP (cada uno) 2,0 mM, pH 7,5, ARN polimerasa T7Y69F 200 nM, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud.

40 **[0161]** Para cada una de lo anterior (a) la transcripción se realiza preferentemente a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 50°C, preferentemente de aproximadamente 30°C a 45°C, y más preferentemente a aproximadamente 37°C durante un periodo de al menos dos horas y (b) se usa 50-300 nM de un molde de transcripción de ADN bicatenario (se usa molde 200 nM en la ronda 1 para aumentar la diversidad (se usa molde 300 nM en las transcripciones dRmY)), y para las rondas posteriores se usa aproximadamente 50 nM, a 1/10 dilución de una reacción de PCR optimizada usando condiciones descritas en este documento). Los moldes de transcripción de ADN preferidos se describen más adelante (cuando ARC254 y ARC256 transcriben bajo todas las condiciones de 2'-OMe y ARC255 transcribe bajo condiciones de rRmY).

50 SEQ ID NO: 82

5'-CATCGATGCTAGTCGTAACGATCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGAGAACGTTCTCTCCTCTCCCT  
ATAGTGAGTCGTATTA-3'

SEQ ID NO: 83

5'-CATGCA'CGCGACTGACTAGCCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTA  
TAGTGAGTCGTATTA-3'

SEQ ID NO: 84

5'-CATCGATCGATCGATCGACAGCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTA  
TAGTGAGTCGTATTA-3'

**[0162]** Bajo condiciones de transcripción rN de la presente divulgación, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OH-adenosina trifosfatos (ATP), 2'-OH-guanosina trifosfatos (GTP), 2'-OH-citidina trifosfatos (CTP) y 2'-OH-uridina trifosfatos (UTP). Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción rN de la presente divulgación comprenden sustancialmente todos 2'-OH-adenosina, 2'-OH-guanosina, 2'-OH-citidina y 2'-OH-uridina. En una realización preferida de la transcripción rN, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 80% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH-adenosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OH-citidina y al menos el 80% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OH-uridina. En una realización más preferida de la transcripción rN, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente divulgación comprenden una secuencia en la que al menos el 90% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH-adenosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OH-citidina y al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OH-uridina. En una realización más preferida de la transcripción rN, los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación comprenden una secuencia en la que el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH-adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OH-citidina y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OH-uridina.

**[0163]** Bajo condiciones de transcripción rRmY de la presente divulgación, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OH-adenosina trifosfatos, 2'-OH-guanosina trifosfatos, 2'-OMe-citidina trifosfatos y 2'-OMe-uridina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción rRmY de la presente divulgación comprenden sustancialmente todos 2'-OH-adenosina, 2'-OH-guanosina, 2'-OMe-citidina y 2'-OMe-uridina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 80% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH-adenosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe-citidina y al menos el 80% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe-uridina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 90% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH-adenosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe-citidina y al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe-uridina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH-adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe-citidina y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe-uridina.

**[0164]** Bajo condiciones de transcripción dRmY de la presente divulgación, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-desoxi-adenosina trifosfatos, 2'-desoxi-guanosina trifosfatos, 2'-O-metil-citidina trifosfatos y 2'-O-metil-uridina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las condiciones de transcripción dRmY de la presente divulgación comprenden sustancialmente todos 2'-desoxi-adenosina, 2'-desoxi-guanosina, 2'-O-metil-citidina y 2'-O-metil-uridina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente divulgación comprenden una secuencia en la que al menos el 80% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-desoxi-adenosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-desoxi-guanosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina y al menos el 80% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente divulgación comprenden una secuencia en la que al menos el 90% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-desoxi-adenosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-desoxi-guanosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina y al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente divulgación comprenden una secuencia en la que el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-desoxi-adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-desoxi-guanosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina.

**[0165]** Bajo condiciones de transcripción rGmH de la presente divulgación, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OH-guanosina trifosfatos, 2'-O-metil-citidina trifosfatos, 2'-O-metil-uridina trifosfatos y 2'-O-metil-adenosina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción rGmH de la presente divulgación comprenden sustancialmente todos 2'-OH-guanosina, 2'-O-metil-citidina, 2'-O-metil-uridina y 2'-O-metil-adenosina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 80% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina y al menos el 80% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil-adenosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina y al menos el 90% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil-adenosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que el 100% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina, el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina y el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil-adenosina.

**[0166]** Bajo condiciones de transcripción r/mGmH de la presente divulgación, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-O-metil-adenosina trifosfato, 2'-O-metil-citidina trifosfato, 2'-O-metil-guanosina trifosfato, 2'-O-metil-uridina trifosfato y 2'-OH-guanosina trifosfato. Los oligonucleótidos modificados resultantes producidos usando las mezclas de transcripción r/mGmH de la presente divulgación comprenden sustancialmente todos 2'-O-metil-adenosina, 2'-O-metil-citidina, 2'-O-metil-guanosina y 2'-O-metil-uridina, en el que la población de nucleótidos de guanosina tiene un máximo de aproximadamente el 10% de 2'-OH-guanosina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados con r/mGmH resultantes de la presente divulgación comprenden una secuencia en la que al menos el 80% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil-adenosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil-guanosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina, y no más de aproximadamente el 10% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 90% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil-adenosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil-guanosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina, y no más de aproximadamente el 10% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil-adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina, el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil-guanosina y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina, y no más de aproximadamente el 10% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina.

**[0167]** Bajo condiciones de transcripción mRmY de la presente divulgación, la mezcla de transcripción sólo comprende 2'-O-metil-adenosina trifosfato, 2'-O-metil-citidina trifosfato, 2'-O-metil-guanosina trifosfato, 2'-O-metil-uridina trifosfato. Los oligonucleótidos modificados resultantes producidos usando la mezcla de transcripción mRmY de la presente invención comprenden una secuencia en la que el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil-adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina, el 100% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil-guanosina y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina.

**[0168]** Bajo condiciones de transcripción fGmH de la presente divulgación, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-O-metil-adenosina trifosfatos, 2'-O-metil-uridina trifosfatos, 2'-O-metil-citidina trifosfatos y 2'-F-guanosina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las condiciones de transcripción fGmH de la presente divulgación comprenden sustancialmente todos 2'-O-metil-adenosina, 2'-O-metil-uridina, 2'-O-metil-citidina y 2'-F-guanosina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 80% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil-adenosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina y al menos el 80% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-F-guanosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 90% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil-adenosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina y al menos el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-F-guanosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil-adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina y el 100% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-F-guanosina.

**[0169]** Bajo condiciones de transcripción dAmB de la presente divulgación, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-desoxi-adenosina trifosfatos, 2'-O-metil-citidina trifosfatos, 2'-O-metil-guanosina trifosfatos y 2'-O-metil-uridina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción dAmB de la presente divulgación comprenden sustancialmente todos 2'-desoxi-adenosina, 2'-O-metil-citidina, 2'-O-metil-guanosina y 2'-O-metil-uridina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 80% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-desoxi-adenosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil-guanosina y al menos el 80% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 90% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-desoxi-adenosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil-guanosina y al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente divulgación comprenden una secuencia en la que el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-desoxi-adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil-citidina, el 100% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil-guanosina y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil-uridina.

**[0170]** En cada caso, los productos de transcripción pueden entonces usarse para la entrada en el procedimiento SELEX™ para identificar aptámeros y/o para determinar una secuencia conservada que tiene

especificidad de unión por una diana dada. Las secuencias resultantes ya están parcialmente estabilizadas, eliminándose esta etapa del procedimiento pos-SELEX™ para llegar a una secuencia de aptámeros optimizada y dando como resultado un aptámero más altamente estabilizado. Otra ventaja del procedimiento SELEX™ de 2'-OMe es que es probable que las secuencias resultantes tengan menos 2'-OH-nucleótidos requeridos en la secuencia, posiblemente ninguno. Hasta el punto que los 2'-OH-nucleótidos que quedan pueden eliminarse realizando modificaciones pos-SELEX™.

**[0171]** Como se describe más adelante, rendimientos menores pero todavía útiles de los transcritos que incorporan completamente nucleótidos sustituidos en 2' pueden obtenerse en condiciones distintas a las condiciones optimizadas descritas anteriormente. Por ejemplo, las variaciones a las condiciones de transcripción anteriores incluyen:

**[0172]** La concentración de tampón HEPES puede oscilar de 0 a 1 M. La presente divulgación también contempla el uso de otros agentes de tamponamiento que tienen una pKa entre 5 y 10 que incluyen, por ejemplo, tris-hidroximetil-aminometano.

**[0173]** La concentración de DTT puede oscilar de 0 a 400 mM. Los procedimientos de la presente divulgación también proporcionan el uso de otros agentes reductores que incluyen, por ejemplo, mercaptoetanol.

**[0174]** La concentración de espermidina y/o espermina puede oscilar de 0 a 20 mM.

**[0175]** La concentración de PEG-8000 puede oscilar del 0 al 50 % (peso/volumen). Los procedimientos de la presente divulgación también proporcionan el uso de otro polímero hidrófilo que incluye, por ejemplo, PEG de otro peso molecular u otros polialquilenglicoles.

**[0176]** La concentración de Triton X-100 puede oscilar del 0 al 0,1% (peso/volumen). Los procedimientos de la presente divulgación también proporcionan el uso de otros detergentes no iónicos que incluyen, por ejemplo, otros detergentes que incluyen otros detergentes de Triton-X.

**[0177]** La concentración de MgCl<sub>2</sub> puede oscilar de 0,5 mM a 50 mM. La concentración de MnCl<sub>2</sub> puede oscilar de 0,15 mM a 15 mM. Tanto MgCl<sub>2</sub> como MnCl<sub>2</sub> deben estar presentes dentro de los intervalos descritos y en una realización preferida están presentes en aproximadamente una relación de 10 a aproximadamente 3 de MgCl<sub>2</sub>:MnCl<sub>2</sub>, preferentemente, la relación es aproximadamente 3-5:1, más preferentemente, la relación es aproximadamente 3-4:1.

**[0178]** La concentración de 2'-OMe-NTP (cada NTP) puede oscilar de 5 μM a 5 mM.

**[0179]** La concentración de 2'-OH-GTP puede oscilar de 0 μM a 300 μM.

**[0180]** La concentración de 2'-OH-GMP puede oscilar de 0 a 5 mM.

**[0181]** El pH puede oscilar de pH 6 a pH 9. Los procedimientos de la presente divulgación pueden ponerse en práctica dentro del intervalo de pH de la actividad de la mayoría de las polimerasas que incorporan nucleótidos modificados. Además, los procedimientos de la presente divulgación proporcionan el uso óptimo de agentes quelantes en la condición de reacción de transcripción que incluyen, por ejemplo, EDTA, EGTA y DTT.

#### QUÍMICA MEDICINAL DE LOS APTÁMEROS

**[0182]** La Química medicinal de los aptámeros es una técnica de mejora de aptámeros en la que conjuntos de aptámeros variantes se sintetizan químicamente. Estos conjuntos de variantes normalmente se diferencian del aptámero parental por la introducción de un único sustituyente, y se diferencian entre sí por la localización de este sustituyente. Entonces, estas variantes se comparan entre sí y con el parental. Las mejoras en las características pueden ser suficientemente profundas de forma que la inclusión de un único sustituyente puede ser todo lo que es necesario para lograr un criterio terapéutico particular.

**[0183]** Alternativamente, la información recogida del conjunto de variantes individuales puede usarse para diseñar adicionalmente conjuntos de variantes en los que más de un sustituyente se introducen simultáneamente. En una estrategia de diseño se clasifican todas las variantes de un solo sustituyente, las 4 primeras se eligen y se sintetizan y se ensayan todas las posibles combinaciones dobles (6), triples (4) y cuádruples (1) de estas 4 variantes de un solo sustituyente. En una segunda estrategia de diseño, la mejor variante de un solo sustituyente se considera que es la nueva parental y se sintetizan y se ensayan todas las posibles variantes de doble sustituyente que incluyen esta variante con la mayor clasificación de un solo sustituyente. Pueden usarse otras estrategias, y estas estrategias pueden aplicarse repetidamente de forma que el número de sustituyentes aumente gradualmente a la vez que continúan identificándose variantes adicionalmente mejoradas.

**[0184]** La Química medicinal de los aptámeros puede usarse particularmente como un procedimiento para

explorar la introducción local, en vez de global, de sustituyentes. Debido a que los aptámeros se descubren dentro de bibliotecas que se generan por transcripción, cualquier sustituyente que se introduzca durante el procedimiento SELEX™ debe introducirse globalmente. Por ejemplo, si se desea introducir enlaces fosforotioato entre nucleótidos, entonces sólo pueden introducirse en cada A (o cada G, C, T, U, etc.) (globalmente sustituidas). Los aptámeros que requieren fosforotioatos en algunas A (o algunas G, C, T, U, etc.) (localmente sustituidas), pero no pueden tolerarlos en otras A, no pueden descubrirse fácilmente por este procedimiento.

**[0185]** Los tipos de sustituyente que puede utilizarse por el procedimiento de Química medicinal de los aptámeros sólo están limitados por la capacidad para generarlos como reactivos de síntesis en fase sólida e introducirlos en un esquema de síntesis de oligómeros. El procedimiento no se limita ciertamente a nucleótidos solos. Los esquemas de Química medicinal de los aptámeros pueden incluir sustituyentes que introducen volumen estérico, hidrofobia, hidrofilia, lipofilia, lipofobia, carga positiva, carga negativa, carga neutra, iones bipolares, polarizabilidad, resistencia a nucleasas, rigidez conformacional, flexibilidad conformacional, características de unión a proteínas, masa, etc. Los esquemas de Química medicinal de los aptámeros pueden incluir modificaciones de bases, modificaciones de azúcares o modificaciones de enlaces fosfodiéster.

**[0186]** Si se consideran los tipos de sustituyentes que probablemente van a ser beneficiosos dentro del contexto de un agente terapéutico de aptámero, puede desearse introducir sustituciones que se encuentran en una o más de las siguientes categorías:

(1) Sustituyentes ya presentes en el cuerpo, por ejemplo, 2'-desoxi-, 2'-ribo-, 2'-O-metil-purinas o pirimidinas o 5-metil-citosina.

(2) Sustituyentes ya parte de un agente terapéutico aprobado, por ejemplo, oligonucleótidos ligados a fosforotioato.

(3) Sustituyentes que hidrolizan o degradan a una de las dos categorías anteriores, por ejemplo, oligonucleótidos ligados a metilfosfonato.

**[0187]** Los aptámeros de PDGF de la divulgación incluyen aptámeros desarrollados por Química medicinal de los aptámeros como se describe en este documento.

#### APTÁMEROS DE UNIÓN ESPECÍFICA A PDGF Y PDGF-VEGF COMO AGENTES TERAPÉUTICOS ONCOLÓGICOS

**[0188]** Los aptámeros que pueden específicamente unirse e inhibir diferentes isoformas de PDGF se exponen en este documento. Estos aptámeros, que incluyen aptámeros que sólo se unen a PDGF, aptámeros que se unen tanto a PDGF como a VEGF, y cualquiera de los aptámeros anteriores que tienen un motivo CpG incorporado en su interior, proporcionan una modalidad de baja toxicidad, segura y eficaz para inhibir la mayoría de la progresión tumoral mediada por PDGF que incluye, sin limitación, glioblastomas, leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), dermatofibrosarcoma protuberante (DFSP), tumores del estroma gastrointestinal, (TEGI) y otros sarcomas de tejido blando.

**[0189]** Ejemplos de aptámeros de unión específica a PDGF y PDGF-VEGF para su uso como agentes terapéuticos en oncología incluyen las siguientes secuencias:

##### Aptámeros de unión a PDGF:

**[0190] ARC126:** 5'-(5'-NH<sub>2</sub>-dC-dA-dG-dG-dC-fU-dA-fC-mG-3', SEC ID N° 1)-HEG-(5'-dC-dG-T-dA-mG-dA-mG-dC-dA-fU-fC-mA-3', SEC ID N° 2)-HEG-(5'-T-dG-dA-T-fC-fC-fU-mG-3'dT-3', SEC ID N° 3)-3' en la que HEG = amidita de hexaetilenglicol.

**[0191] ARC127:** 5'-[PEG de 40 K]-(5'-NH<sub>2</sub>-dC-dA-dG-dG-dC-fU-dA-fC-mG-3', SEC ID N° 1)-HEG-(5'-dC-dG-T-dA-mG-dA-mG-dC-dA-fU-fC-mA-3', SEC ID N° 2)-HEG-(5'-T-dG-dA-T-fC-fC-fU-mG-3'dT-3', SEC ID N° 3)-3' en la que HEG = amidita de hexaetilenglicol.

**[0192] ARC240:** 5'-[PEG de 20 K]-(5'-NH<sub>2</sub>-dC-dA-dG-dG-dC-fU-dA-fC-mG-3', SEC ID N° 1)-HEG-(5'-dC-dG-T-dA-mG-dA-mG-dC-dA-fU-fC-mA-3', SEC ID N° 2)-HEG-(5'-T-dG-dA-T-fC-fC-fU-mG-3'dT-3', SEC ID N° 3)-3' en la que HEG = amidita de hexaetilenglicol.

**[0193] ARC308:** 5'-[PEG de 30 K]-(5'-NH<sub>2</sub>-dC-dA-dG-dG-dC-fU-dA-fC-mG-3', SEC ID N° 1)-HEG-(5'-dC-dG-T-dA-mG-dA-mG-dC-dA-fU-fC-mA-3', SEC ID N° 2)-HEG-(5'-T-dG-dA-T-fC-fC-fU-mG-3'dT-3', SEC ID N° 3)-3' en la que HEG = amidita de hexaetilenglicol.

**[0194] DesoxiARC126:** 5'-dCdAdGdGdCdTdAdCdGdCdGdTdAdGdAdGdCdAdTdCdAdTdGdAdTdCdCdTdG-[3T]-3' (SEC ID N°: 8) en la que "d" indica desoxi-nucleótidos sin modificar y "[3T]" se refiere a un nucleótido de

timina invertido unido al extremo 3' del oligonucleótido.

**[0195] ARC124:** 5' CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG-3'InvdT (SEC ID N°: 11) en la que 3'InvdT se refiere a un nucleótido de timina invertido unido al extremo 3' del oligonucleótido.

Aptámero de control negativo:

**[0196] ARC128:** (ARC126 de control negativo): 5'-(5'- NH<sub>2</sub>-dC-dA-dG-fC-mG-fU-dA-fC-mG-3', SEC ID N° 4)-HEG-(5'- dC-dG-dT-dA-dC-dC-mG-dA-dT-fU-fC-mA-3', SEC ID N° 5)-HEG-(5'- dT-dG-dA-dA-dG-fC-fU-mG-3'dT-3', SEC ID N° 6)-3' en la que HEG = amidita de hexaetilenglicol.

Aptámero de unión a VEGF:

**[0198] ARC245:** 5'-mAmUmGmCmAmGmUmUmUmGmAmGmAmAmGmUmCmGmCmGmCmAmU-[3T]-3' (SEC ID N°: 7) en la que "m" indica 2'-OMe-nucleótidos y "[3T]" se refiere a un nucleótido de timina invertido que está unido al extremo 3' del oligonucleótido en la posición 3' sobre la azúcar ribosa; por tanto, el oligonucleótido tiene dos extremos 5' y, por tanto, es resistente a nucleasas que actúan sobre el extremo hidroxilo en 3'.

Aptámeros multivalentes de unión a PDGF/VEGF:

**[0199] TK.131.012.A:** (SEC ID N°: 9) :

5'dCdAdGdGdCdTdAdCdGmAmUmGmCmAmGmUmUmUmGmAmGmAmAmGmUmCmGmCmGmCmAmUdCdGdTdAdGdAdGdCdAdTdCdAdGdAdAdAdTdGdAdTdCdCd TdG-[3T]-3' en la que "m" indica 2'-OMe-nucleótidos, "d" y "[3T]"son como se definen anteriormente.

**[0200] TK.131.012.B:** (SEC ID N°: 10):

5'dCdAdGdGdCdTdAdCdGmUmGmCmAmGmUmUmUmGmAmGmAmAmGmUmCmGmCmGmCmAdCdGdTdAdGdAdGdCdAdTdCdAdGdAdAdAdTdGdAdTdCdCdTdG-[3T]-3' en la que "m" y "[3T]" son como se definen anteriormente.

**[0201]** Otros aptámeros que se unen a PDGF y/o VEGF se describen más adelante, por ejemplo, en la Tabla 2 y en el Ejemplo 12.

**[0202]** Se ha demostrado que la inhibición de la señalización de PDGF con antagonistas de receptores de moléculas pequeñas disminuye la presión del líquido intersticial y aumenta la captación de agentes quimioterapéuticos en tumores sólidos. Pietras y col. validaron la hipótesis de que PDGF-B participa en PLI y que el bloqueo de la función de PDGF-B podría conducir a un aumento de la captación de agentes quimioterapéuticos en tumores (Pietras y col., (2003), Cancer Cell vol. 3 pág. 439-443). Usando el modelo de carcinoma tiroideo KAT-4, que tiene propiedades de señalización paracrina de PDGF, Pietras y col. demostraron que los tumores KAT-4 expresaron receptores  $\beta$  de PDGF en el estoma y que PDGF-B se unió a células KAT-4 *in vitro*. A continuación, Pietras y col. usaron el fármaco inhibidor de tirosina cinasa STI571 (GLEEVEC™) para bloquear la señalización de PDGF-B en tumores KAT-4 y mostraron que este tratamiento disminuyó significativamente la PLI del tumor *in vivo* conduciendo a un aumento de la captación de taxol. Sin embargo, como STI571 elige como diana tanto los receptores  $\alpha$  como  $\beta$  de PDGF, además de tirosina cinasas Kit, Abl y Arg, fue imposible saber si el efecto de STI571 era debido al bloqueo de PDGF-B solo. Esta ambigüedad se resolvió usando un aptámero altamente específico para bloquear PDGF-B en experimentos similares. El aptámero tiene una afinidad de 100 pM para PDGF-B y no tiene afinidad apreciable por la secuencia de PDGF-A. Al igual que con STI571, el tratamiento de ratones con xenoinjerto KAT-4 con aptámero de PDGF-B conjugado con PEG redujo la PLI y aumentó espectacularmente la captación de taxol por el tumor. Y, lo que es más importante, el tratamiento con aptámeros potenció fuertemente la capacidad del taxol para inhibir el crecimiento del tumor. Además, se ha mostrado que un agente terapéutico contra el cáncer actualmente comercializado, el antagonista del receptor de PDGF GLEEVEC™, es eficaz en la reducción de la PLI tumoral y en el aumento de la captación de citotoxinas por el tumor cuando se usan en combinación con una citotoxina tal como taxol. Los procedimientos y materiales de la presente se usan para inhibir la actividad biológica de PDGF-B y su etiología en el desarrollo y crecimiento del tumor por potenciamiento de la captación y eficacia de agentes quimioterapéuticos.

**[0203]** Los procedimientos de terapia de combinación de la presente divulgación incluyen combinar aptámeros específicos para PDGF de la presente divulgación con agentes citotóxicos. Sin desear ceñirse a ninguna teoría, el combinar aptámeros específicos para PDGF con otras citotoxinas conocidas puede proporcionar un procedimiento eficaz de administración de fármaco específicamente en el sitio de tumores, por ejemplo, por la reducción selectiva de la PLI en vasos tumorales. A su vez permite el aumento de la captación de citotoxinas en tumores por la vasculatura tumoral. La Figura 4 muestra un esquema del transporte de citotoxinas a través de la vasculatura tumoral con y sin antagonistas de PDGF mediante los procedimientos de la presente invención (Pietras y col., (2003), Cancer Cell vol. 3 pág. 439-443).

**[0204]** Los aptámeros de PDGF de la presente divulgación pueden usarse en combinación con una variedad de agentes citotóxicos o citostáticos conocidos (en conjunto "citotóxicos") para reducir la PLI tumoral y así aumentar la administración y captación por el tumor de agentes citotóxicos a todos los tumores sólidos. Agentes citotóxicos o citostáticos adecuados incluyen estabilizadores/desestabilizadores de la tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos y agentes alquilantes de ADN u otros agentes modificadores de ADN que incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel (TAXOL™), docetaxel, irinotecan, topotecan, gemcitabina, epotilona, cisplatino, carboplatino, 5-fluoro-U, calicheamicina, doxorubicina, metotrexato, AraC (citarabina), vinblastina, daunorubicina, oxaliplatino, ciclofosfamida, iflosamida, farmorubicina, epirubicina, vinflunina, oblimersen sódico, perimetrexed, inhibidores de cinasas que incluyen, pero no se limitan a, cinasa de receptores de EGF, cinasa de receptores de VEGF, aurora cinasa, tanto solos como en cualquier combinación de los mismos. Los aptámeros de PDGF de la presente divulgación pueden usarse en combinación con una variedad de agentes de elección de diana vasculares conocidos en los que el "agente de elección de diana vascular" significa un agente terapéutico de molécula pequeña (por ejemplo, irinotecan), un agente terapéutico de proteína (por ejemplo, bevicizumab) y/o un agente terapéutico de oligonucleótido (por ejemplo, moléculas antisentido, moléculas de ARNip) que modifica la red de vasculatura y neovasculatura existente que suministra la sangre y el flujo linfático al tumor. Los aptámeros de PDGF de la presente divulgación pueden usarse en combinación con un conjugado terapéutico que comprende un resto de unión o de elección de diana y un resto citotóxico, en el que el resto de unión o de elección de diana es, pero no se limita a, un aptámero, anticuerpo que incluye, pero no se limita a, trastuzumab, rituximab, cetuximab, panitumumab, gemtuzumab, bevicizumab y tositumomab, péptido, un agente de elección de diana vascular o compuesto de folato, y en el que el resto citotóxico pertenece a una clase de compuestos que incluye, pero no se limita a, estabilizadores/desestabilizadores de la tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos y agentes alquilantes de ADN, otros agentes modificadores de ADN, o agentes disruptivos vasculares (por ejemplo, flavonoides) solos o en cualquier combinación de los mismos.

**[0205]** Los materiales y procedimientos de la presente divulgación proporcionan una forma más eficaz de administrar agentes quimioterapéuticos conocidos para inhibir la formación de tumores sólidos que produce una variedad de cánceres que incluyen, pero no se limitan a, cáncer colorrectal, pancreático, de mama, de pulmón, de próstata y de ovario.

**[0206]** Además, las composiciones de aptámero de PDGF de la presente divulgación pueden usarse como agentes antiangiogénicos para inhibir la formación de vasculatura tumoral que eligen pericitos como diana. En un ejemplo, una composición de aptámero de PDGF de la presente divulgación puede usarse en combinación con un antagonista de VEGF/VEGFR tal como un aptámero específico para VEGF. Tales combinaciones pueden proporcionar una forma más eficaz para inhibir la angiogénesis tumoral que tanto un agente terapéutico de aptámero de PDGF como un agente terapéutico de antagonistas de VEGF/VEGFR solo. Una ventaja de los agentes que eligen PDGF-B y VEGF como diana de la presente divulgación es que las composiciones terapéuticas de la presente divulgación son sumamente específicas para su ligando diana y de ahí que no parezca que presenten actividad de tirosina cinasa inespecífica; y no están diseñadas para entrar en células para provocar su función biológica.

**[0207]** Los agentes terapéuticos de inhibidores de cinasas de moléculas pequeñas actualmente comercializados, por ejemplo GLEEVEC™, presentan alta actividad inespecífica. GLEEVEC™ elige como diana los receptores tanto  $\alpha$  como  $\beta$  de tirosina cinasas, además de las tirosina cinasas BCR-Abl, C-kit y Arg. La actividad inespecífica es en general un impedimento importante para el desarrollo de inhibidores de cinasas de moléculas pequeñas. Adicionalmente, los inhibidores de cinasas de moléculas pequeñas tales como GLEEVEC™ se administran a o casi a sus dosis máximas toleradas cuando se usan en el tratamiento de tumores sólidos. La toxicidad de GLEEVEC™ y otros inhibidores de tirosina cinasas (TKI) está probablemente limitada por tanto efectos secundarios relacionados con el mecanismo como efectos secundarios no relacionados con el mecanismo (inespecíficos). Basándose en experimentos *in vivo* con ARC127 (5'-[PEG de 40 K]-(SEC ID N° 1)-HEG-(SEC ID N° 2)-HEG-(SEC ID N° 3)-3'-dT-3') y ARC308 (5'-[PEG de 30 K]-(SEC ID N° 1)-HEG-(SEC ID N° 2)-HEG-(SEC ID N° 3)-3'-dT-3') no fueron evidentes efectos secundarios limitantes de la dosis. Ventajas adicionales son que las composiciones terapéuticas de aptámero de la presente divulgación pueden administrarse por las vías intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. A diferencia de los agentes terapéuticos contra el cáncer de anticuerpos monoclonales que son inmunogénicos, los aptámeros no son inmunogénicos; por tanto, la reacción con el fármaco y/o la resistencia al fármaco no son un problema.

#### APTÁMEROS PARA ISOFORMAS DE PDGF Y PDGF

**[0208]** Los materiales de la presente divulgación comprenden una serie de aptámeros de ácidos nucleicos de 31-35 nucleótidos de longitud (SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 9 a SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 36 a SEC ID N°: 73, SEC ID N°: 85, y SEC ID N°: 77 a SEC ID N°: 81, y SEC ID N°: 86-89, 91, 93-95 y 102) que se unen específicamente a la proteína de PDGF-B *in vitro* y que funcionalmente bloquean la actividad de PDGF-BB en ensayos *in vivo* y basados en células. Las secuencias de aptámeros anti-PDGF-B de la presente divulgación se derivan de una molécula parental (ARC126 (5'-(SEC ID N° 1)-HEG-(SEC ID N° 2)-HEG-(SEC ID N° 3)-3'-dT-3') que contiene siete residuos individuales que contienen 2'F (Figura 9A). Los residuos que contienen 2'F se incorporaron en ARC126 para aumentar la estabilidad en suero *in vitro* e *in vivo* del agente terapéutico de aptámero bloqueando

su degradación por endonucleasas y/o exonucleasas del suero. En un esfuerzo por sustituir los residuos de nucleótidos que contienen 2'F posiblemente tóxicos en el aptámero anti-PDGF-B ARC126 se ha identificado una nueva serie de aptámeros completamente libres de 2'F. Los nuevos aptámeros de la presente divulgación retienen una potente actividad de unión y antiproliferativa *in vitro* y contienen nucleótidos sustituidos con 2'-desoxi o 2'-OME que se producen naturalmente. Estos nuevos aptámeros de la presente divulgación también retienen una sustancial estabilidad en suero como se determina por la resistencia a la degradación por nucleasas en un ensayo de estabilidad *in vitro*, sin degradación detectada durante hasta 48 horas.

**[0209]** Los agentes terapéuticos de aptámero de la presente divulgación tienen una gran afinidad y especificidad por PDGF, isoformas de PDGF y/o receptor de PDGF, a la vez que reducen los efectos secundarios perjudiciales de las sustituciones de nucleótidos que se producen no naturalmente cuando los agentes terapéuticos de aptámero se rompen en el cuerpo de pacientes o sujetos. Las composiciones terapéuticas que contienen los agentes terapéuticos de aptámero de la presente divulgación están libres o tienen una cantidad reducida de nucleótidos fluorados.

#### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS PARA AUMENTAR LA EFICACIA DE AGENTES ANTITUMORALES

**[0210]** Los materiales y procedimientos de la presente divulgación comprenden además procedimientos para aumentar la eficacia de agentes tumorales por terapia dual con los aptámeros de la presente divulgación, tal como ARC127 y ARC308. Además, los experimentos descritos en este documento han demostrado que los aptámeros específicos para PDGF-B, ARC 127 (es decir, ARC126 + PEG de 40 K) y ARC308 (es decir, ARC 126 + PEG de 30 K), son agentes tumorales activos cuando se coadministran con irinotecan a ratones sin pelo que llevan el xenoinjerto de tumor LS174T colorrectal. Los compuestos terapéuticos contra el cáncer de la presente divulgación (por ejemplo, tanto ARC 127 como ARC308) son agentes no citotóxicos seguros cuando se administran solos, pero en combinación con otros agentes citotóxicos, ARC 127 y ARC308 potencian sus efectos antitumorales mediante un novedoso mecanismo de acción. Además, el aptámero ARC 127 derivado del suero, cuando se administra a ratones parenteralmente, es decir, intravenosamente, subcutáneamente o por inyección intraperitoneal, retiene la actividad biológica completa.

#### QUIMERA DE APTÁMEROS ESPECÍFICA PARA PDGF-B Y VEGF

**[0211]** La divulgación proporciona además una quimera de aptámeros bifuncional que elige como diana tanto PDGF-B como VEGF. La quimera de aptámeros de PDGF-B-VEGF TK.131.12.A (SEC ID N°: 9) y TK.131.12.B (SEC ID N°: 10) de la presente divulgación permiten la elección simultánea como diana de PDGF-B y VEGF, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer. El aptámero de PDGF-B usado en la molécula quimérica se deriva de la secuencia del aptámero de ARC127. El aptámero de VEGF que se usó en la molécula quimérica se deriva de la secuencia del aptámero de ARC245 (SEC ID N°: 7). La quimera de aptámeros de la presente divulgación puede construirse a partir de cualquier conjunto de aptámeros de unión a PDGF-B y VEGF. La quimera de PDGF-B-VEGF de la presente divulgación es útil en el tratamiento de tumores sólidos dependientes de VEGF que también muestran un alto grado de neovascularización, además del reclutamiento de pericitos para suministrar la vasculatura naciente.

**[0212]** Datos antitumorales recientes del modelo de tumor de ratón pancreático RipTag sugieren que hay una mayor inhibición en el crecimiento del tumor conferido cuando la terapia anti-VEGF y anti-PDGFR se realizan simultáneamente que cuando tanto el agente anti-VEGF como el agente anti-PDGFR se añaden solos (Bergers y col., (2003), J. Clin. Invest., 111:9, pág. 1287-1295). Como la terapia anti-PDGFR bloquea todos los acontecimientos de señalización mediados por receptores, puede esperarse que los efectos de esta terapia no sean específicos y, por tanto, sufre efectos secundarios asociados a tratamientos no específicos. A diferencia, la quimera PDGF-B-VEGF en esta divulgación proporciona la elección precisa de PDGF-B y VEGF como diana en tumores.

**[0213]** Los agentes terapéuticos de aptámero de la presente divulgación tienen una gran afinidad y especificidad por VEGF y/o el receptor de VEGF, a la vez que reducen los efectos secundarios perjudiciales de las sustituciones de nucleótidos que se producen no naturalmente que pueden resultar cuando los agentes terapéuticos de aptámero se rompen en el cuerpo de un paciente o sujeto. Las composiciones terapéuticas de los agentes terapéuticos de aptámero de la presente divulgación están libres de o tienen una cantidad reducida de nucleótidos fluorados.

#### APTÁMEROS QUE TIENEN MOTIVOS INMUNOESTIMULANTES

**[0214]** El reconocimiento de ADN bacteriano por el sistema inmunitario vertebrado se basa en el reconocimiento de dinucleótidos CG sin metilar, en particular contextos de secuencia ("motivos CpG"). Un receptor que reconoce un motivo tal es el receptor similar a toll 9 ("TLR 9"), un miembro de una familia de los receptores similares a toll (~10 miembros) que participa en la respuesta inmunitaria innata reconociendo componentes microbianos distintos. El TLR 9 se une a secuencias de CpG del oligodesoxi-nucleótido (ODN) sin metilar de un modo específico para secuencia. El reconocimiento de motivos CpG desencadena mecanismos de defensa que conducen a respuestas inmunitarias innatas y en último lugar a adquiridas. Por ejemplo, la activación de TLR 9 en ratones induce la activación de células presentadoras de antígeno, la regulación por incremento de moléculas del

MHC de clase I y II y la expresión de importantes moléculas y citocinas coestimulantes que incluyen IL-12 y IL-23. Esta activación potencia tanto directamente como indirectamente respuestas de linfocitos B y T que incluyen la consistente expresión por incremento de la citocina TH1 IFN-gamma. En conjunto, la respuesta a secuencias de CpG conduce a: protección contra enfermedades infecciosas, respuesta inmunitaria mejorada a vacunas, una respuesta eficaz contra el asma y citotoxicidad mejorada mediada por células dependientes de anticuerpo. Por tanto, los ODN de CpG pueden proporcionar protección contra enfermedades infecciosas, funcionan de inmunoadyuvantes o agentes terapéuticos contra el cáncer (monoterapia o en combinación con mAb u otras terapias), y puede disminuir el asma y la respuesta alérgica.

**[0215]** Los aptámeros que comprenden uno o más motivos CpG pueden identificarse o generarse mediante una variedad de estrategias usando, por ejemplo, el procedimiento SELEX™ descrito en este documento. En general, las estrategias pueden dividirse en dos grupos. En el primer grupo, las estrategias están dirigidas a identificar o generar aptámeros que comprenden tanto un sitio de unión para dianas distintas de aquellas que reconocen motivos CpG como un motivo CpG. Estas estrategias son del siguiente modo: (a) realizar SELEX™ para obtener un aptámero para una diana específica (distinta de una diana que se sabe que se une a motivos CpG y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria), preferentemente una diana en la que una respuesta inmunitaria reprimida es relevante para el desarrollo de enfermedad, usando un conjunto de oligonucleótidos en el que un motivo CpG se ha incorporado en cada miembro del conjunto como, o como parte de, una región fija, por ejemplo, en la región al azar de los miembros del conjunto; (b) realizar SELEX para obtener un aptámero para una diana específica (distinta de una diana que se sabe que se une a motivos CpG y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria), preferentemente una diana en la que una respuesta inmunitaria reprimida es relevante para el desarrollo de enfermedad, y luego unir un motivo CpG al extremo 5' y/o 3' o manipular un motivo CpG en una región, preferentemente una región no esencial, del aptámero; (c) realizar SELEX™ para obtener un aptámero para una diana específica (distinta de una diana que se sabe que se une a motivos CpG y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria), preferentemente una diana en la que una respuesta inmunitaria reprimida es relevante para el desarrollo de enfermedad, en la que durante la síntesis del conjunto la relación molar de los diversos nucleótidos está favorecida en una o más etapas de adición de nucleótidos de manera que la región al azar de cada miembro del conjunto está enriquecida en motivos CpG; y (d) realizar SELEX™ para obtener un aptámero para una diana específica (distinta de una diana que se sabe que se une a motivos CpG y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria), preferentemente una diana en la que una respuesta inmunitaria reprimida es relevante para el desarrollo de enfermedad, e identificar aquellos aptámeros que comprenden un motivo CpG.

**[0216]** En el segundo grupo, las estrategias están dirigidas a identificar o generar aptámeros que comprenden un motivo CpG y/u otras secuencias que se unen por los receptores para los motivos CpG (por ejemplo, TLR9 o los otros receptores similares a toll) y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria. Estas estrategias son del siguiente modo: (i) realizar SELEX™ para obtener un aptámero para una diana que se sabe que se une a motivos CpG y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria usando un conjunto de oligonucleótidos en el que un motivo CpG se ha incorporado en cada miembro del conjunto como, o como parte de, una región fija, por ejemplo, en la región al azar de los miembros del conjunto; (ii) realizar SELEX para obtener un aptámero para una diana que se sabe que se une a motivos CpG y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria y luego unir un motivo CpG al extremo 5' y/o 3' o manipular un motivo CpG en una región, preferentemente una región no esencial, del aptámero; (iii) realizar SELEX para obtener un aptámero para una diana que se sabe que se une a motivos CpG y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria en la que durante la síntesis del conjunto, la relación molar de los diversos nucleótidos está favorecida en una o más etapas de adición de nucleótidos de manera que la región al azar de cada miembro del conjunto está enriquecida en motivos CpG; (iv) realizar SELEX para obtener un aptámero para una diana que se sabe que se une a motivos CpG y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria e identificar aquellos aptámeros que comprenden un motivo CpG; y (v) realizar SELEX para obtener un aptámero para una diana que se sabe que se une a motivos CpG e identificar aquellos aptámeros que, tras la unión, estimulan una respuesta inmunitaria que no comprende un motivo CpG.

**[0217]** Se han identificado una variedad de diferentes clases de motivos CpG, produciendo cada uno tras el reconocimiento una cascada diferente de acontecimientos, liberación de citocinas y otras moléculas, y activación de ciertos tipos de células. Véase, por ejemplo, CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects, Annu. Rev. Immunol. 2002, 20:709-760. Motivos inmunoestimulantes adicionales se desvelan en las siguientes patentes de EE.UU.: 6.207.646; 6.239.116; 6.429.199; 6.214.806; 6.653.292; 6.426.434; 6.514.948 y 6.498.148. Cualquiera de estos CpG u otros motivos inmunoestimulantes pueden incorporarse en un aptámero. La elección de aptámeros depende de la enfermedad o trastorno que va a tratarse. Motivos inmunoestimulantes preferidos son los siguientes (mostrados de 5' a 3' de izquierda a derecha) en los que "r" designa una purina, "y" designa una pirimidina y "X" designa cualquier nucleótido:

AACGTTTCGAG (SEC ID N°: 85); AACGTT (SEC ID N°: 90); ACGT (SEC ID N°: 92), rCGy (SEC ID N°: 96); rrCGyy (SEC ID N°: 98), XCGX (SEC ID N°: 99),

XXCGXX (SEC ID N°: 100) y  $X_1X_2CGY_1Y_2$  (SEC ID N°: 101) en las que  $X_1$  es G o A,  $X_2$  no es C,  $Y_1$  no es G y  $Y_2$  es preferentemente T.

**[0218]** En aquellos casos en los que un motivo CpG se incorpora en un aptámero que se une a una diana específica distinta de una diana que se sabe que se une a motivos CpG y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria (una “diana no CpG”), CpG se localiza preferentemente en una región no esencial del aptámero. Las regiones no esenciales de aptámeros pueden identificarse por mutagénesis dirigida a sitio, análisis de deleción y/o análisis de sustitución. Sin embargo, puede usarse cualquier localización que no interfiera significativamente con la capacidad del aptámero para unirse a la diana no CpG. Además de estar incorporado dentro de la secuencia del aptámero, el motivo CpG puede unirse a uno cualquiera o a ambos de los extremos 5' y 3' o unido de otro modo al aptámero. Puede usarse cualquier localización o medio de unión mientras que la capacidad del aptámero para unirse a la diana no CpG no interfiera significativamente.

**[0219]** Como se usa en este documento, “estimulación de una respuesta inmunitaria” puede significar tanto (1) la inducción de una respuesta específica (por ejemplo, inducción de una respuesta Th1) o de la producción de ciertas moléculas como (2) la inhibición o supresión de una respuesta específica (por ejemplo, inhibición o supresión de la respuesta Th2) o de ciertas moléculas.

**[0220]** Los motivos CpG pueden incorporarse o unirse a un aptámero contra cualquier diana que incluye, pero no se limita a: PDGF, IgE, IgE Fcε RI, TNFα, PSMA, CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, FcRIIB, BTLA, TIM-3, CD11b, CD-11c, BAFF, B7-X, CD19, CD20, CD25 y/o CD33.

**[0221]** Incorporando motivos CpG en aptámeros que eligen específicamente tumores sólidos como diana, estos aptámeros pueden usarse para activar el sistema inmunitario mediante el reclutamiento de células presentadoras de antígeno que han absorbido material derivado de tumor, potenciar su maduración y migración a ganglios linfáticos locales y aumentar el cebado de linfocitos T específicos para tumor. Esto es especialmente relevante cuando los aptámeros liberan carga útil citotóxica y producen muerte celular (tal como un aptámero de PSMA que contiene un motivo CpG). Tales aptámeros que contienen motivos CpG también pueden inducir respuesta de memoria específica para tumores (por ejemplo, un uso profiláctico). Además, la reducción de PLI y los efectos de bloqueo del reclutamiento de pericitos de un aptámero de PDGF-B, combinado con el aumento de la respuesta inmunitaria observada tras la administración de CpG, representa un potente agente terapéutico para el cáncer. Por tanto, los aptámeros con motivos CpG incorporados, unidos o insertados representan una clase novedosa de compuestos anticancerígenos. Cuando estos compuestos se administran pueden conducir a una significativa citorreducción quirúrgica del tumor por dos mecanismos: primero, por activación de linfocitos T específicos para tumores dentro del lecho tumoral y segundo por la acción basada en el mecanismo previsto del farmacóforo de aptámero.

### COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

**[0222]** La divulgación también incluye composiciones farmacéuticas que contienen moléculas de aptámero. En algunas realizaciones, las composiciones son adecuadas para uso interno e incluyen una cantidad eficaz de un compuesto farmacológicamente activo de la divulgación, solo o en combinación, con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos son especialmente útiles porque tienen toxicidad muy baja, si la tienen.

**[0223]** Las composiciones de la divulgación pueden usarse para tratar o prevenir una patología tal como una enfermedad o trastorno, o aliviar los síntomas de tal enfermedad o trastorno en un paciente. Las composiciones de la divulgación son útiles para administración a un sujeto que padece, o tiene predisposición a, una enfermedad o trastorno que está relacionado con o derivado de una diana a la que los aptámeros de la divulgación se unen específicamente. Por ejemplo, la diana es una proteína implicada en una patología, por ejemplo, la proteína diana produce la patología. Por ejemplo, la diana es la implicación de PDGF en el desarrollo y la progresión de tumores sólidos.

**[0224]** Las composiciones de la divulgación pueden usarse en un procedimiento para tratar un paciente o sujeto que tiene una patología. El procedimiento implica administrar al paciente o sujeto una composición que comprende aptámeros que se unen a una diana (por ejemplo, una proteína) implicada en la patología, de forma que la unión de la composición a la diana altera la función biológica de la diana, tratándose así la patología.

**[0225]** El paciente o sujeto que tiene una patología, por ejemplo, el paciente o sujeto tratado mediante los procedimientos de esta divulgación, puede ser un mamífero, o más particularmente un ser humano.

**[0226]** En la práctica, los aptámeros o sus sales farmacéuticamente aceptables se administran en cantidades que serán suficientes para ejercer su actividad biológica deseada, por ejemplo, inhibir la unión de una citocina a su receptor.

**[0227]** Un aspecto de la divulgación comprende una composición de aptámero de la divulgación en combinación con otros tratamientos para cáncer o trastornos relacionados con el cáncer. La composición de aptámero de la divulgación puede contener, por ejemplo, más de un aptámero. En algunos ejemplos, una composición de aptámero de la divulgación, que contiene uno o más compuestos de la divulgación, se administra en

combinación con otra composición útil tal como un agente antiinflamatorio, un inmunodepresor, un agente antivírico o similares. Además, los compuestos de la divulgación pueden administrarse en combinación con un agente citotóxico, citostático o quimioterapéutico tal como un agente alquilante, antimetabolito, inhibidor mitótico o antibiótico citotóxico, como se ha descrito anteriormente. En general serán adecuadas las formas de dosificación actualmente disponibles de los agentes terapéuticos conocidos para su uso en tales combinaciones.

**[0228]** “Terapia de combinación” (o “co-terapia”) incluye la administración de una composición de aptámero de la divulgación y al menos un segundo agente como parte de una pauta de tratamiento específica prevista para proporcionar el efecto beneficioso de la co-acción de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, co-acción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación normalmente se lleva a cabo durante un periodo de tiempo definido (normalmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada).

**[0229]** La “terapia de combinación” puede pretender englobar, pero generalmente no, la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de pautas de monoterapia separadas que casualmente y arbitrariamente producen las combinaciones de la presente divulgación. “Terapia de combinación” pretende englobar la administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, es decir, en la que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, además de la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, en un modo sustancialmente simultáneo. La administración sustancialmente simultánea puede llevarse a cabo, por ejemplo, administrando al sujeto una única cápsula que tiene una relación fija de cada agente terapéutico o en cápsulas individuales múltiples para cada uno de los agentes terapéuticos.

**[0230]** La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico puede efectuarse por cualquier vía apropiada que incluye, pero no se limita a, vías tópicas, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y la absorción directa a través de los tejidos de la membrana mucosa. Los agentes terapéuticos pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada puede administrarse por inyección, mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación pueden administrarse tópicamente.

**[0231]** Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos pueden administrarse tópicamente o todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por inyección. La secuencia en la que los agentes terapéuticos se administran no es exhaustivamente crítica. La “terapia de combinación” también puede englobar la administración de los agentes terapéuticos como se ha descrito anteriormente en combinación adicional con otros principios biológicamente activos. Si la terapia de combinación comprende además un tratamiento sin fármaco, el tratamiento sin fármaco puede realizarse en cualquier momento adecuado, mientras que se logre un efecto beneficioso de la co-acción de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento sin fármaco. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso todavía se alcanza cuando el tratamiento de no fármaco se elimina temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás por días o incluso semanas.

**[0232]** Los compuestos de la divulgación y el otro agente farmacológicamente activo pueden administrarse a un paciente simultáneamente, secuencialmente o en combinación. Se apreciará que si se usa una combinación de la divulgación, el compuesto de la divulgación y el otro agente farmacológicamente activo pueden estar en el mismo vehículo farmacéuticamente aceptable y, por tanto, administrarse simultáneamente. Pueden estar en vehículos farmacéuticos separados tales como formas de dosificación orales convencionales que se toman simultáneamente. El término “combinación” se refiere adicionalmente al caso en el que los compuestos se proporcionan en formas de dosificación separadas y se administran secuencialmente.

**[0233]** Las composiciones terapéuticas o farmacológicas de la presente divulgación comprenderán generalmente una cantidad eficaz del (de los) componente(s) activo(s) de la terapia, disuelto(s) o disperso(s) en un medio farmacéuticamente aceptable. Medios o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es muy conocido en la técnica. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones terapéuticas de la presente divulgación.

**[0234]** La preparación de composiciones farmacéuticas o farmacológicas será conocida para aquellos expertos en la materia en vista de la presente divulgación. Normalmente, tales composiciones pueden prepararse como inyectables, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones; formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección; como comprimidos u otros sólidos para administración por vía oral; como cápsulas de liberación con el tiempo; o en cualquier otra forma actualmente usada que incluye colirios, cremas, lociones, bálsamos, inhalantes y similares. El uso de formulaciones estériles, tales como lavados basados en solución salina, también puede ser particularmente útil por cirujanos, médicos o trabajadores sanitarios para tratar un área particular en el campo de operación. Las composiciones también pueden administrarse por un microdispositivo, micropartícula o esponja.

5 [0235] Tras la formulación, los agentes terapéuticos se administrarán de un modo compatible con la forma de dosificación, y en cantidad tal que sea farmacológicamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación. En una realización preferida, el aptámero de la divulgación se formula como una disolución inyectable descrita anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

10 [0236] En este contexto, la cantidad de principio activo y volumen de composición que va a administrarse depende del animal huésped que va a tratarse. Las cantidades precisas de compuesto activo requeridas para la administración dependen del juicio del médico y son características para cada individuo.

15 [0237] Normalmente se utiliza un volumen mínimo de una composición requerida para dispersar los compuestos activos. También son viables pautas adecuadas para la administración, pero se tipificarían por la administración inicial del compuesto y monitorizando los resultados y luego administrando adicionalmente dosis controladas a más intervalos.

20 [0238] Por ejemplo, para administración por vía oral en forma de un comprimido o cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), el componente de fármaco activo puede combinarse con un vehículo inerte oral no tóxico farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse aglutinantes, lubricantes, agentes de disgregación y agentes colorantes adecuados en la mezcla. Aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato sódico, cloruro sódico, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, almidones de goma xantana, agar, ácido alginico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes y similares. Los diluyentes, incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

30 [0239] Las composiciones inyectables son preferentemente disoluciones o suspensiones isotónicas acuosas y los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan según procedimientos de mezcla, granulación o recubrimiento convencionales, respectivamente, y contienen aproximadamente del 0,1 al 75%, preferentemente aproximadamente del 1 a 50%, del principio activo.

40 [0240] Los compuestos de la divulgación también pueden administrarse en tales formas de dosificación orales como comprimidos o cápsulas de liberación controlada y de liberación sostenida, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones.

45 [0241] Las composiciones líquidas, particularmente inyectables, pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc. El compuesto activo se disuelve en o se mezcla con un disolvente farmacéuticamente puro tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para así formar la disolución o suspensión inyectable. Adicionalmente pueden formularse formas sólidas adecuadas para disolver en líquido antes de la inyección. Las composiciones inyectables son preferentemente disoluciones o suspensiones acuosas isotónicas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas.

50 [0242] Los compuestos de la presente divulgación pueden administrarse en forma intravenosa (tanto en bolo como infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular usando todas formas muy conocidas para aquellos expertos en las técnicas farmacéuticas. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones.

55 [0243] La administración de inyectables parenterales se usa generalmente para inyecciones e infusiones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Adicionalmente, un enfoque para la administración parenteral emplea la implantación de sistemas de liberación lenta o de liberación sostenida que aseguran que se mantiene un nivel constante de dosificación, según la patente de EE.UU. nº 3.710.795.

60 [0244] Además, los compuestos preferidos para la presente divulgación pueden administrarse en forma intranasal por uso tópico de vehículos intranasales adecuados, o por vías transdérmicas, usando aquellas formas de parches transdérmicos para la piel muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Para administrarse en forma de un sistema de administración transdérmica, la administración de dosificación será, por supuesto, continua en vez de intermitente durante toda la pauta de dosificación. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, pomadas, lociones, esprays de aerosol y geles, en los que la concentración de principio activo oscilaría del 0,01% al

15%, peso/peso o peso/volumen.

**[0245]** Para composiciones sólidas pueden usarse excipientes que incluyen calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. El compuesto activo definido anteriormente también puede formularse como supositorios usando, por ejemplo, polialquilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol, como vehículo. En algunas realizaciones, los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

**[0246]** Los compuestos de la presente divulgación también pueden administrarse en forma de sistemas de administración de liposomas tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, una película de componentes lipídicos se hidrata con una disolución acuosa de fármaco para formar una capa lipídica que encapsula el fármaco, como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.262.564. Por ejemplo, las moléculas de aptámero descritas en este documento pueden proporcionarse como un complejo con un compuesto lipófilo o compuesto no inmunogénico de alto peso molecular construido usando procedimientos conocidos en la materia. Un ejemplo de complejos asociados a ácidos nucleicos se proporciona en la patente de EE.UU. n° 6.011.020.

**[0247]** Los compuestos de la presente divulgación también pueden acoplarse a polímeros solubles como vehículos de fármaco que pueden elegirse como diana. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polihidroxietilspanamidafenol o poli(óxido de etileno)-polilisina sustituido con residuos de palmitoílo. Además, los compuestos de la presente divulgación pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles en conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliepsilon-caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

**[0248]** Si se desea, la composición farmacéutica que va a administrarse también puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH y otras sustancias tales como, por ejemplo, acetato sódico y oleato de trietanolamina.

**[0249]** La pauta de dosificación que utiliza los aptámeros se selecciona según una variedad de factores que incluyen tipo, especie, edad, peso, sexo y afección médica del paciente; la gravedad de la afección que va a tratarse; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el aptámero particular o sal del mismo empleado. Un médico o veterinario generalmente experto puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz del fármaco requerida para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

**[0250]** Las dosificaciones orales de la presente divulgación, cuando se usan para los efectos indicados, oscilarán entre aproximadamente 0,05 y 7500 mg/día por vía oral. Las composiciones se proporcionan preferentemente en forma de comprimidos ranurados que contienen 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100,0, 250,0, 500,0 y 1000,0 mg de principio activo. Las dosificaciones infundidas, dosificaciones intranasales y dosificaciones transdérmicas oscilarán entre 0,05 y 7500 mg/día. Las dosificaciones subcutáneas, intravenosas e intraperitoneales oscilarán entre 0,05 y 3800 mg/día.

**[0251]** Los compuestos de la presente divulgación pueden administrarse en una única dosis diaria, o la dosificación diaria total puede administrarse en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día.

**[0252]** Niveles en plasma eficaces de los compuestos de la presente divulgación oscilan de 0,002 mg/ml a 50 mg/ml. En las dosificaciones de la presente divulgación, masa se refiere sólo al peso molecular de la porción de oligonucleótido del aptámero, independientemente de la masa conferida por la conjugación con PEG.

#### MODULACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA Y BIODISTRIBUCIÓN DE AGENTES TERAPÉUTICOS DE APTÁMERO

**[0253]** Es importante que las propiedades farmacocinéticas para todos los agentes terapéuticos basados en oligonucleótidos, que incluyen aptámeros, se confeccionen para coincidir con la aplicación farmacéutica deseada. Mientras que los aptámeros dirigidos contra dianas extracelulares no padecen las dificultades asociadas a la administración intracelular (como es el caso con agentes terapéuticos antisentido y basados en ARNi), tales aptámeros todavía deben poder distribuirse a órganos y tejidos diana, y permanecer en el cuerpo (sin modificar) durante un periodo de tiempo de acuerdo con la pauta de dosificación deseada.

**[0254]** Por tanto, la presente divulgación proporciona materiales y procedimientos para afectar la farmacocinética de composiciones de aptámero y, en particular, la capacidad para ajustar la farmacocinética de aptámeros. La capacidad para ajustar (es decir, la capacidad para modular) la farmacocinética de aptámeros se logra por la conjugación de restos modificadores (por ejemplo, polímeros de PEG) con el aptámero y/o la incorporación de nucleótidos modificados (por ejemplo, 2'-flúor o 2'-O-metilo) para alterar la composición química del ácido nucleico. La capacidad para ajustar la farmacocinética de aptámeros se usa en la mejora de aplicaciones

terapéuticas existentes, o alternativamente en el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en el contexto antineoplásico o agudo en el que puede desearse una rápida eliminación o salida del fármaco, se desea disminuir los tiempos de residencia de los aptámeros en la circulación. Alternativamente, en otras aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, terapias de mantenimiento en las que se desea la circulación sistémica de un agente terapéutico, puede desearse aumentar los tiempos de residencia de aptámeros en la circulación.

**[0255]** Además, la capacidad para ajustar la farmacocinética de aptámeros se usa para modificar la biodistribución de un agente terapéutico de aptámero en un sujeto. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas puede desearse alterar la biodistribución de un agente terapéutico de aptámero en un esfuerzo por elegir como diana un tipo particular de tejido o un órgano específico (o conjunto de órganos). En estas aplicaciones, el agente terapéutico de aptámero se acumula preferencialmente en un tejido u órgano(s) específico(s). En otras aplicaciones terapéuticas puede desearse elegir como diana tejidos que muestran un marcador celular o un síntoma asociado a una enfermedad, lesión celular u otra patología anormal, de forma que el agente terapéutico de aptámero se acumule preferencialmente en el tejido afectado. Por ejemplo, como se describe en la solicitud provisional de Estados Unidos n° de serie 60/550790 presentada el 5 de marzo de 2004 y titulada "Modulación controlada de la farmacocinética y biodistribución de agentes terapéuticos de aptámero", la PEGilación de un agente terapéutico de aptámero (por ejemplo, PEGilación con un polímero de PEG de 20 kDa) se usa para elegir como diana tejidos inflamados, de forma que el agente terapéutico de aptámero PEGilado se acumula preferencialmente en tejido inflamado.

**[0256]** Para determinar los perfiles farmacocinéticos y de biodistribución de agentes terapéuticos de aptámero (por ejemplo, conjugados de aptámeros o aptámeros que tienen químicas alteradas tales como nucleótidos modificados), una variedad de parámetros son tales parámetros que incluyen, por ejemplo, la semivida ( $t_{1/2}$ ), la eliminación del plasma (CL), el volumen de distribución ( $V_{ss}$ ), el área bajo la curva de concentración-tiempo (ABC), concentración en suero o en plasma observada máxima ( $C_{máx}$ ) y el tiempo de residencia medio (MRT) de una composición de aptámero. Como se usa en este documento, el término "ABC" se refiere al área bajo la representación de la concentración en plasma de un agente terapéutico de aptámero frente al tiempo después de la administración del aptámero. El valor del ABC se usa para estimar la biodisponibilidad (es decir, el porcentaje de agente terapéutico de aptámero administrado en la circulación después de la administración del aptámero) y/o eliminación total (CL) (es decir, la tasa a la que el agente terapéutico de aptámero se elimina de la circulación) de un agente terapéutico de aptámero dado. El volumen de distribución se refiere a la concentración en plasma de un agente terapéutico de aptámero con respecto a la cantidad de aptámero presente en el cuerpo. Cuanto mayor sea  $V_{ss}$ , más aptámero se encuentra fuera del plasma (es decir, más extravasación).

**[0257]** La presente divulgación proporciona materiales y procedimientos para modular, de una manera controlada, la farmacocinética y biodistribución de composiciones de aptámero estabilizadas *in vivo* conjugando un aptámero con un resto modulador tal como una molécula pequeña, grupo terminal de péptido o polímero, o incorporando nucleótidos modificados en un aptámero. Como se describe en este documento, la conjugación de una composición química de resto modificador y/o nucleótido(s) de alteración altera aspectos fundamentales del tiempo de residencia de los aptámeros en circulación y la distribución a los tejidos.

**[0258]** Además de la eliminación por nucleasas, los agentes terapéuticos de oligonucleótidos están sometidos a eliminación por filtración renal. Como tal, un oligonucleótido resistente a nucleasas administrado intravenosamente presenta normalmente un semivida *in vivo* de < 10 min, a menos que pueda bloquearse la filtración. Esto puede llevarse a cabo tanto facilitando la rápida distribución fuera de la corriente sanguínea en tejidos como aumentando el peso molecular aparente del oligonucleótido por encima del corte de tamaño eficaz para el glomérulo. La conjugación de agentes terapéuticos pequeños con un polímero de PEG (PEGilación), descrito más adelante, puede alargar espectacularmente los tiempos de residencia de aptámeros en circulación, disminuyendo así la frecuencia de dosificación y potenciando la eficacia contra dianas vasculares.

**[0259]** Los aptámeros pueden conjugarse con una variedad de restos modificadores tales como polímeros de alto peso molecular, por ejemplo, PEG; péptidos, por ejemplo, Tat (un fragmento de 13 aminoácidos de la proteína Tat del VIH (Vives y col., (1997), J. Biol. Chem. 272(25): 16010-7)), Ant (una secuencia de 16 aminoácidos derivada de la tercera hélice de la proteína homeótica de *Drosophila antennapedia* (Pietersz y col., (2001), Vaccine 19(11-12): 1397-405)) y Arg<sub>7</sub> (un péptido corto positivamente cargado que permea células compuesto por poliarginina (Arg<sub>7</sub>) (Rothbard y col., (2000), Nat. Med. 6(11): 1253-7; Rothbard, J y col., (2002), J. Med. Chem. 45(17): 3612-8)); y moléculas pequeñas, por ejemplo, compuestos lipófilos tales como colesterol. Entre los diversos conjugados descritos en este documento, las propiedades de aptámeros *in vivo* son las que se alteran más profundamente por complejación con grupos PEG. Por ejemplo, la complejación de un agente terapéutico de aptámero modificado con 2'F y 2'-OMe mixto con un polímero de PEG de 20 kDa dificulta la filtración renal y promueve la distribución de aptámeros a tanto tejidos sanos como inflamados. Además, el conjugado de polímero de PEG de 20 kDa-aptámero demuestra ser casi tan eficaz como un polímero de PEG de 40 kDa en la prevención de la filtración renal de aptámeros. Mientras que un efecto de PEGilación está en la eliminación de aptámeros, la exposición sistémica prolongada proporcionada por la presencia del resto de 20 kDa también facilita la distribución de aptámero a tejidos, particularmente aquellos de órganos altamente perfundidos y aquellos en el sitio de inflamación. El conjugado de

aptámero-polímero de PEG de 20 kDa dirige la distribución de aptámeros al sitio de inflamación, de forma que el aptámero PEGilado se acumula preferencialmente en tejido inflamado. En algunos casos, el conjugado de aptámero PEGilado con 20 kDa puede acceder al interior de las células tales como, por ejemplo, células de riñón. Los nucleótidos modificados también pueden usarse para modular la eliminación de aptámeros del plasma. Por ejemplo, un aptámero sin conjugar que incorpora químicas estabilizantes de tanto 2'-F como 2'-OMe, que son típicas de aptámeros de la generación actual, ya que presenta un alto grado de estabilidad a nucleasas *in vitro* e *in vivo*, muestra una rápida pérdida del plasma (es decir, rápida eliminación del plasma) y una rápida distribución en tejidos, principalmente en el riñón, cuando se compara con el aptámero sin modificar.

## 10 ÁCIDOS NUCLEICOS DERIVATIZADOS CON PEG

15 **[0260]** Como se ha descrito anteriormente, la derivatización de ácidos nucleicos con polímeros no inmunogénicos de alto peso molecular tiene la posibilidad de alterar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de ácidos nucleicos haciendo que sean agentes terapéuticos más eficaces. Cambios favorables en la actividad pueden incluir disminución de la resistencia a la degradación por nucleasas, disminución de la filtración por los riñones, disminución de la exposición al sistema inmunitario y distribución alterada del agente terapéutico por el cuerpo.

20 **[0261]** Las composiciones de aptámero de la divulgación pueden derivatizarse con restos de polialquilenglicol (PAG). Ejemplos de ácidos nucleicos derivatizados por PAG se encuentran en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 10/718.833 presentada el 21 de noviembre de 2003. Polímeros típicos usados en la divulgación incluyen poli(etilenglicol) (PEG), también conocido como poli(óxido de etileno) (PEO) y polipropilenglicol (incluyendo poliiisopropilenglicol). Adicionalmente, en muchas aplicaciones pueden usarse copolímeros al azar o de bloques de diferentes óxidos de alquileo (por ejemplo, óxido de etileno y óxido de propileno). En su forma más común, un polialquilenglicol tal como PEG es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos hidroxilo: HO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH. Este polímero, alfa-,omega-dihidroxi polietilenglicol, también puede representarse como HO-PEG-OH en la que se entiende que el símbolo -PEG- representa la siguiente unidad estructural: -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- en la que n oscila normalmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 10.000.

30 **[0262]** Como se muestra, la molécula de PEG es di-funcional y algunas veces se denomina en lo sucesivo "PEG-diol". Las porciones terminales de la molécula de PEG son restos hidroxilo relativamente no reactivos, los grupos -OH, que pueden activarse, o convertirse en restos funcionales, para la unión del PEG a otros compuestos en sitios reactivos en el compuesto. Tales PEG-dioles activados se denominan en este documento PEG bi-activados. Por ejemplo, los restos terminales de PEG-diol se han funcionalizado como éster de carbonato activo para la reacción selectiva con restos amino por sustitución de los restos hidroxilo relativamente no reactivos, -OH, con restos éster activo de succinimidilo de N-hidroxi succinimida.

40 **[0263]** En muchas aplicaciones se desea tapar la molécula de PEG en un extremo con un resto esencialmente no reactivo de manera que la molécula de PEG sea mono-funcional (o mono-activada). En el caso de agentes terapéuticos de proteína que generalmente muestran múltiples sitios de reacción para PEG activados, los PEG activados bi-funcionales conducen a una amplia reticulación, dando agregados escasamente funcionales. Para generar PEG mono-activados, un resto hidroxilo en el extremo de la molécula de PEG-diol normalmente está sustituido con un resto del extremo metoxi no reactivo, -OCH<sub>3</sub>. El otro extremo sin tapar de la molécula de PEG normalmente se convierte en un resto del extremo reactivo que puede activarse para la unión a un sitio reactivo sobre una superficie o una molécula tal como una proteína.

50 **[0264]** Los PAG son polímeros que normalmente tienen propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos, carecen de toxicidad y carecen de inmunogenicidad. Un uso de PAG es para unir covalentemente el polímero a moléculas insolubles para hacer soluble el "conjugado" de PAG-molécula resultante. Por ejemplo, se ha mostrado que el fármaco insoluble en agua paclitaxel, cuando se acopla a PEG, se vuelve soluble en agua. Greenwald y col., J. Org. Chem., 60:331-336 (1995). Los conjugados de PAG se usan frecuentemente no sólo para potenciar la solubilidad y estabilidad, sino también para prolongar la semivida en la circulación de la sangre de las moléculas.

55 **[0265]** Los compuestos polialquilados de la divulgación tienen normalmente entre 5 y 80 kDa de tamaño; sin embargo, puede usarse cualquier tamaño, dependiendo la elección del aptámero y la aplicación. Otros compuestos de PAG de la divulgación tienen entre 10 y 80 kDa de tamaño. Todavía otros compuestos de PAG de la divulgación tienen entre 10 y 60 kDa de tamaño. Por ejemplo, un polímero de PAG puede tener al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 u 80 kDa de tamaño. Tales polímeros pueden ser lineales o ramificados. En algunas realizaciones, los polímeros son PEG. En alguna realización, los polímeros son PEG ramificado. En todavía otras realizaciones, los polímeros son PEG ramificado de 40 kDa como se representa en la Figura 5. En algunas realizaciones, el PEG ramificado de 40 kDa está unido al extremo 5' del aptámero como se representa en la Figura 6.

65 **[0266]** A diferencia de los agentes terapéuticos de proteína biológicamente expresados, los agentes terapéuticos de ácido nucleico se sintetizan normalmente químicamente a partir de nucleótidos de monómeros

activados. Los conjugados de PEG-ácido nucleico pueden prepararse incorporando el PEG usando la misma síntesis iterativa de monómeros. Por ejemplo, los PEG activados por conversión a una forma de fosforamidita pueden incorporarse en la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. Alternativamente, la síntesis de oligonucleótido puede completarse con incorporación específica para sitio de un sitio de unión a PEG reactivo. Más comúnmente, esto se ha realizado mediante la adición de una amina primaria libre al extremo 5' (incorporada usando una fosforamidita modificadora en la última etapa de acoplamiento de la síntesis en fase sólida). Usando este enfoque, un PEG reactivo (por ejemplo, uno que se activa de manera que reaccionará y formará un enlace con una amina) se combina con el oligonucleótido purificado y la reacción de acoplamiento se lleva a cabo en disolución.

**[0267]** La capacidad de conjugación de PEG para alterar la biodistribución de un agente terapéutico está relacionada con varios factores que incluyen el tamaño aparente (por ejemplo, como se mide en términos de radio hidrodinámico) del conjugado. Se sabe que conjugados más grandes (> 10 kDa) bloquean más eficazmente la filtración por el riñón y por consiguiente aumentan la semivida en suero de macromoléculas pequeñas (por ejemplo, péptidos, oligonucleótidos antisentido). Se ha mostrado que la capacidad de los conjugados de PEG para bloquear la filtración aumenta con el tamaño de PEG hasta aproximadamente 50 kDa (aumentos adicionales tienen un efecto beneficioso mínimo ya que la semivida se define por el metabolismo mediado por macrófagos en vez de la eliminación por los riñones).

**[0268]** La producción de PEG de alto peso molecular (>10 kDa) puede ser difícil, ineficiente y cara. Como una vía hacia la síntesis de conjugados de PEG de alto peso molecular-ácido nucleico, el trabajo previo se ha basado en la generación de PEG activados de mayor peso molecular. Un procedimiento para generar tales moléculas implica la formación de un PEG activado ramificado en el que dos o más PEG están unidos a un núcleo central que lleva el grupo activado. Las porciones terminales de estas moléculas de PEG de mayor peso molecular, es decir, los restos hidroxilo (-OH) relativamente no reactivos, pueden activarse, o convertirse en restos funcionales, para la unión de uno o más de los PEG a otros compuestos en sitios reactivos en el compuesto. Los PEG activados ramificados tendrán más de dos extremos, y en los casos en los que se hayan activado dos o más extremos, tales moléculas de PEG de mayor peso molecular activadas se denominan en este documento PEG multi-activados. En algunos casos no se activan todos los extremos en una molécula de PEG ramificada. En los casos en los que se activan dos extremos cualesquiera de una molécula de PEG ramificada, tales moléculas de PEG se denominan en lo sucesivo PEG bi-activados. En algunos casos en los que sólo se activa un extremo en una molécula de PEG ramificada, tales moléculas de PEG se denominan en lo sucesivo mono-activadas. Como un ejemplo de este enfoque se ha descrito el PEG activado preparado por la unión de dos monometoxi-PEG a un núcleo de lisina que posteriormente se activa para la reacción (Harris y col., Nature, vol. 2: 214-221, 2003).

**[0269]** La presente divulgación proporciona otra ruta rentable para la síntesis de conjugados de PEG de alto peso molecular-ácido nucleico (preferentemente aptámero) que incluyen ácidos nucleicos multi-PEGilados. La presente divulgación también engloba oligonucleótidos multiméricos ligados a PEG, por ejemplo, aptámeros dimerizados. La presente divulgación también se refiere a composiciones de alto peso molecular en las que un resto estabilizador de PEG es un ligador que separa diferentes porciones de un aptámero, por ejemplo, el PEG está conjugado dentro de una única secuencia del aptámero, de forma que la disposición lineal de la composición de alto peso molecular del aptámero es, por ejemplo, ácido nucleico - PEG - ácido nucleico (- PEG - ácido nucleico)<sub>n</sub> en la que n es mayor o igual a 1.

**[0270]** Las composiciones de alto peso molecular de la divulgación incluyen aquellas que tienen un peso molecular de al menos 10 kDa. Las composiciones tienen normalmente un peso molecular entre 10 y 80 kDa de tamaño. Las composiciones de alto peso molecular de la divulgación tienen al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 u 80 kDa de tamaño.

**[0271]** Un resto estabilizante es una molécula, o porción de una molécula, que mejora las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de las composiciones de aptámero de alto peso molecular de la divulgación. En algunos casos, un resto estabilizante es una molécula o porción de una molécula que lleva dos o más aptámeros, o dominios de aptámero, en proximidad, o proporciona una disminución de la libertad rotacional global de las composiciones de aptámero de alto peso molecular de la divulgación. Un resto estabilizante puede ser un polialquilenglicol, como un polietilenglicol, que puede ser lineal o ramificado, un homopolímero o un heteropolímero. Otros restos estabilizantes incluyen polímeros tales como ácidos nucleicos de péptidos (PNA). Los oligonucleótidos también pueden ser restos estabilizantes; tales oligonucleótidos pueden incluir nucleótidos modificados y/o enlaces modificados tales como fosforotioatos. Un resto estabilizante puede ser una parte integral de una composición de aptámero, es decir, está covalentemente unido al aptámero.

**[0272]** Las composiciones de la divulgación incluyen composiciones de aptámero de alto peso molecular en las que dos o más restos de ácido nucleico están covalentemente conjugados con al menos un resto de polialquilenglicol. Los restos de polialquilenglicol sirven de restos estabilizantes. En composiciones en las que un resto de polialquilenglicol está covalentemente unido en cualquier extremo con un aptámero, de forma que el polialquilenglicol una los restos de ácido nucleico juntos en una molécula, se dice que el polialquilenglicol es un resto de enlace. En tales composiciones, la estructura primaria de la molécula covalente incluye la disposición lineal ácido nucleico-PAG-ácido nucleico. Un ejemplo es una composición que tiene la estructura primaria ácido nucleico-PEG-

ácido nucleico. Otro ejemplo es una disposición lineal de: ácido nucleico - PEG - ácido nucleico - PEG - ácido nucleico.

**[0273]** Para producir el conjugado de ácido nucleico-PEG-ácido nucleico, el ácido nucleico se sintetiza originalmente de forma que lleve un único sitio reactivo (por ejemplo, esté mono-activado). En una realización preferida, este sitio reactivo es un grupo amino introducido en el extremo 5' mediante adición de una fosforamidita modificadora como última etapa en la síntesis en fase sólida del oligonucleótido. Tras la desprotección y purificación del oligonucleótido modificado, se reconstituye a alta concentración en una disolución que minimiza la hidrólisis espontánea del PEG activado. En una realización preferida, la concentración de oligonucleótido es 1 mM y la disolución reconstituida contiene tampón NaHCO<sub>3</sub> 200 mM, pH 8,3. La síntesis del conjugado se inicia por la adición lenta escalonada de PEG bi-funcional altamente purificado. En una realización preferida, el PEG-diol se activa en ambos extremos (bi-activado) por derivatización con propionato de succinimidilo. Tras la reacción, el conjugado de PEG-ácido nucleico se purifica por electroforesis en gel o cromatografía líquida para separar especies completamente conjugadas, parcialmente conjugadas y sin conjugar. Las moléculas de PAG múltiple concatenadas (por ejemplo, como copolímeros al azar o de bloque) o cadenas de PAG más pequeñas pueden ligarse para lograr diversas longitudes (o pesos moleculares). Los ligadores de no PAG pueden usarse entre cadenas de PAG de longitudes variables.

**[0274]** Las modificaciones de nucleótidos modificados con 2'-O-metilo, 2'-flúor y otros estabilizan el aptámero contra nucleasas y aumentan su semivida *in vivo*. La tapa 3'-3'-dT también aumenta la resistencia a exonucleasas. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.674.685; 5.668.264; 6.207.816; y 6.229.002.

#### DERIVATIZACIÓN DE PAG DE UN ÁCIDO NUCLEICO REACTIVO

**[0275]** Los conjugados de PAG-ácido nucleico-PAG de alto peso molecular pueden prepararse haciendo reaccionar un PEG activado mono-funcional con un ácido nucleico que contiene más de un sitio reactivo. En una realización, el ácido nucleico es bi-reactivo, o bi-activado, y contiene dos sitios reactivos: un grupo amino en 5' y un grupo amino en 3' introducidos en el oligonucleótido por síntesis de fosforamidita convencional, por ejemplo: 3'-5'-di-PEGilación como se ilustra en la Figura 7. En realizaciones alternativas, los sitios reactivos pueden introducirse en posiciones internas usando, por ejemplo, la posición 5' de pirimidinas, la posición 8 de purinas o la posición 2' de ribosa como sitios para la unión de aminas primarias. En tales realizaciones, el ácido nucleico puede tener varios sitios activados o reactivos y se dice que está múltiplemente activado. Tras la síntesis y purificación, el oligonucleótido modificado se combina con el PEG mono-activado en condiciones que promueven la reacción selectiva con los sitios reactivos del oligonucleótido a la vez que minimizan la hidrólisis espontánea. En la realización preferida, el monometoxi-PEG se activa con propionato de succinimidilo y la reacción acoplada se lleva a cabo a pH 8,3. Para accionar la síntesis del PEG bi-sustituido se proporciona PEG en exceso estequiométrico con respecto al oligonucleótido. Tras la reacción, el conjugado de PEG-ácido nucleico se purifica por electroforesis en gel o cromatografía líquida para separar especies completamente conjugadas, parcialmente conjugadas y sin conjugar.

**[0276]** Los dominios de enlace también pueden tener uno o más restos de polialquilenglicol unidos a los mismos. Tales PAG pueden ser de longitudes variables y pueden usarse en combinaciones apropiadas para lograr el peso molecular deseado de la composición.

**[0277]** El efecto de un ligador particular puede influirse tanto por su composición química como por su longitud. Un ligador que es demasiado largo, demasiado corto o forma interacciones estéricas e/o iónicas desfavorables con la diana excluirá la formación del complejo entre el aptámero y la diana. Un ligador que es más largo de lo necesario para abarcar la distancia entre ácidos nucleicos puede reducir la estabilidad de unión disminuyendo la concentración eficaz del ligando. Por tanto, frecuentemente es necesario optimizar las composiciones y longitudes de ligador con el fin de maximizar la afinidad de un aptámero por una diana.

**[0278]** La mención de publicaciones y documentos de patente no está prevista como una admisión de que cualquiera sea técnica anterior pertinente ni de que constituya admisión del contenido o fecha de los mismos.

#### **EJEMPLOS**

##### EJEMPLO 1: Síntesis de aptámeros a gran escala y conjugación

**[0279]** ARC 126 (5'-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3'-dT-3') es un aptámero de 29 nucleótidos (excluyendo una T invertida en el extremo 3') específico para PDGF que contiene una tapa de dT invertida en 3' para potenciar la estabilidad contra el ataque de nucleasas. Los restos de PEG pueden conjugarse con ARC126 usando un modificador del extremo amino en 5' para las posteriores reacciones de conjugación. Las síntesis se realizaron usando química de fosforamidita en fase sólida convencional. El oligonucleótido se desprotegió con hidróxido de amonio/metilamina (1:1) a temperatura ambiente durante 12 horas y se purificó por HPLC de intercambio iónico. ARC 128 (5'-(SEC ID N° 4)-HEG-(SEC ID N°: 5)-HEG-(SEC ID N°: 6)-3'), una variante inactiva que ya no se une a PDGF, se sintetizó usando el mismo procedimiento.

**[0280]** ARC126 se conjugó con varios restos de PEG diferentes: PEG de 20 kDa (ARC240, (5'-[PEG de 20 K]- (SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3'-dT-3')); PEG de 30 kDa (ARC308, (3'-[PEG de 30 K]- (SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3'-dT-3')); PEG de 40 kDa (ARC 127, (5'-[PEG de 40 K]- (SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3'-dT-3')). ARC126 se disolvió a 2 mM en tampón carbonato sódico 100 mM, pH 8,5, y se hizo reaccionar durante 1 hora con un exceso 2,5 molar de mPEG-SPA (MW 20 kDa) o mPEG<sub>2</sub>-éster de NHS (MW 40 kDa) (Shearwater Corp., Huntsville, AL) y exceso 3,5 molar (durante 24 horas) de mPEG-nPNC (MW 30kDa) (NOF Corporation, Tokio, Japón) en volúmenes iguales de acetonitrilo. Entonces, los productos resultantes se purificaron por HPLC de intercambio iónico en una columna de 50 ml Super Q 5PW (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA) usando NaCl acuoso como eluyente. Entonces, los oligonucleótidos conjugados se desalaron en una columna de 100 ml Amberchrom CG300S (Tosoh) usando un gradiente de agua/acetonitrilo. Los conjugados de aptámero se liofilizaron para el almacenamiento.

**[0281]** Con el fin de usar ARC127 en modelos animales, la calidad del material sintetizado se probó para los niveles de endotoxinas. El contenido de endotoxinas del ARC127 sintetizado se determinó usando la prueba de LAL (trabajadores de Nelson Labs, AZ). Los resultados para la prueba de endotoxinas se muestran en la siguiente Tabla 1. Las cantidades detectadas de endotoxina estuvieron por debajo de la norma ISO para disoluciones de irrigación estériles (0,5 UE/ml), es decir, inferiores a los niveles permitidos para administración IV. Esto indicó que las preparaciones de ARC126 y ARC127 eran estériles y que era posible avanzar a los modelos de eficacia en animales.

**Tabla 1.** Niveles de endotoxina en la síntesis a gran escala de aptámeros terapéuticos.

| Muestra       | Dilución | Endotoxina detectada    | Recuperación de la sustancia añadida |
|---------------|----------|-------------------------|--------------------------------------|
| <b>ARC126</b> | 1 :10    | 2,5 UE/ml y 0,52 UE/mg  | 73%                                  |
|               | 1 :100   | 2,8 UE/ml y ,58 UE/mg   | 103%                                 |
|               | 1 :200   | 2,5 UE/ml y 0,52 UE/mg  | 104%                                 |
| <b>ARC127</b> | 1 :1     | 0,19 UE/ml y 0,17 UE/mg | 51%                                  |
|               | 1 :10    | 0,33 UE/ml y 0,30 UE/mg | 97%                                  |
|               | 1 :100   | 0,45 UE/ml y 0,41 UE/mg | 115%                                 |
| <b>ARC128</b> | 1 :1     | 0,52 UE/ml y 0,76 UE/mg | 105%                                 |
|               | 1 :10    | 0,57 UE/ml y 0,82 UE/mg | 127%                                 |
|               | 1 :100   | 0,43 UE/ml y 0,62 UE/mg | 136%                                 |

**[0282]** Se hicieron síntesis a pequeña escala de las variantes del aptámero ARC-126 desfluorado en el sintetizador de ADN Expedite 8909 de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando química convencional de fosforamida en fase sólida y los protocolos de acoplamiento recomendados por el vendedor. Los aptámeros se escindieron y se desprotegeron añadiendo 250 µl de hidróxido de amonio/40% de metilamina acuosa (1:1) al soporte de la columna y se sembraron en un bloque térmico a 65°C durante 30 minutos. Los aptámeros se secaron en Speed Vac (Savant), luego se resuspendieron en 200 µl de H<sub>2</sub>O desionizada. La purificación por HPLC se realizó en HPLC Transgenomic WAVE (Omaha, NE). Las columnas usadas para el intercambio iónico son DNAPAC (Dionex, Sunnyvale, CA) y Resource (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Tampón A: fosfato de sodio 25 mM/25% de acetonitrilo; Tampón B: fosfato de sodio 25 mM/perclorato de sodio 400 mM/25% de acetonitrilo, se usó un gradiente del 0-80% de B. Entonces, las fracciones purificadas se reunieron y se secaron en Speed Vac y se resuspendieron en 200 µl de H<sub>2</sub>O desionizada.

#### EJEMPLO 2: Estudios de estabilidad con aptámeros fluorados

**[0283]** ARC126 y ARC127 recientemente sintetizados en la empresa se compararon con ARC126 y ARC127 heredados que se sintetizaron por Proligo (Boulder, CO) y se habían guardado liofilizados durante 2 años a -20°C. Los aptámeros recientemente sintetizados se denominan en lo sucesivo "ARC126 (Archemix)" y "ARC 127 (Archemix)", mientras que los aptámeros heredados se denominan en lo sucesivo "ARC126 (Proligo)" y "ARC127 (Proligo)".

**[0284]** El ARC127 sintetizado en la empresa y el ARC127 heredado se pasaron por una columna de HPLC de intercambio iónico para el análisis. La Figura 8A es un perfil de un análisis de HPLC de intercambio iónico de ARC 127 recientemente sintetizado (perfil inferior) y heredado (perfil superior) que muestran que, después de 2 años de almacenamiento liofilizado a -20°C, relativamente no se detectó degradación del ARC127 heredado.

**[0285]** Los aptámeros ARC126 y ARC127 heredados guardados a -20°C durante dos años también se probaron para potencia, y se compararon con ARC126 y ARC127 recientemente sintetizados en la empresa usando el ensayo de proliferación de células 3T3 (Ejemplo 3). La Figura 8B muestra los resultados del ensayo basado en células para potencia que demuestran que, incluso después de la liofilización y el almacenamiento a -20 grados Celsius durante 2 años, los aptámeros heredados fueron igual de potentes que ARC126 y ARC127 recientemente sintetizados en la empresa.

EJEMPLO 3A: Composición y optimización de secuencias de variantes de ARC126

**[0286]** La secuencia y la estructura secundaria del aptámero anti-PDGF designado ARC126 se muestra en la Figura 9A. La secuencia y estructura secundaria de derivados de ARC 126 en los que los nucleótidos se han sustituido con sustituyentes 2'-flúor se muestran en la Figura 9B. Los bucles mostrados en los extremos de los dos tallos internos son espaciadores de polietilenglicol 6 (PEG-6) y los nucleótidos modificados se representan por dA = desoxi-adenosina; dG = desoxi-guanosina; mA = 2'-O-metil-adenosina; dT = desoxi-timidina; dC = desoxi-citosina; mG = 2'-O-metil-guanosina; mC = 2'-O-metil-citosina; [3'T] = desoxi-timidina invertida; fC = 2'-fluoro-citosina; y fU = 2'-fluoro-uridina.

**[0287]** Como se muestra en la Figura 9A (panel izquierdo), la composición de 29 nucleótidos de ARC126 contiene siete residuos 2'-flúor (tres 2'-fluoro-uridinas y cuatro 2'-fluoro-citosinas). Debido a consideraciones que incluyen genotoxicidad de productos de degradación, el ARC 126 se optimizó para modificar la composición de la secuencia eliminando todos o la mayoría de los residuos 2'-flúor sin comprometer la potencia o estabilidad de la molécula existente. Una vía para la eliminación de residuos 2'-flúor consistió en la sustitución simple de los siete residuos 2'-flúor con residuos desoxi. Se sintetizó una variante de todo ADN tal de ARC126, designada ARC299 (SEC ID N°: 42-PEG-SEC ID N°: 43-PEG-SEC ID N°: 44 en la que PEG = espaciador de PEG-6) y se probó en ensayos de unión bioquímica *in vitro* y de proliferación basada en células. Estos experimentos mostraron que la simple sustitución de todos los residuos 2'-flúor por residuos desoxi en la composición 29-mera de ARC126 indujo inestabilidad en los tallos centrales y superiores, conduciendo a actividad/potencia significativamente reducida.

**[0288]** El segundo enfoque tomado para efectuar la eliminación de residuos 2'-flúor de ARC126 fue la sustitución, tanto individualmente como en bloques, de residuos 2'-flúor por residuos 2'-O-metilo para mejorar la inestabilidad relativa de apareamiento de bases en los tallos centrales y superiores observados con la composición de todo desoxi. Se sintetizaron varias variantes de composición que representan sustituciones de un único punto de residuos 2'-flúor por residuos 2'-O-metilo o desoxi (ARC277, 5'-(SEC ID N°: 39)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'), además de sustituciones en bloque de residuos 2'-flúor por residuos 2'-O-metilo (ARC337, 5'-(SEC ID N°: 42)-PEG-(SEC ID N°: 43)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'; ARC338, 5'-(SEC ID N°: 52)-PEG-(SEC ID N°: 43)-PEG-(SEC ID N°: 44)-[3'T]-3'; ARC339, 5'-(SEC ID N°: 48)-PEG-(SEC ID N°: 43)-PEG-(SEC ID N°: 53)-[3'T]-3'; ARC340, 5'-(SEC ID N°: 50)-PEG-(SEC ID N°: 43)-PEG-(SEC ID N°: 54)-[3'T]-3'; combinaciones de sustituciones individuales y en bloque (ARC341, 5'-(SEC ID N°: 36)-PEG-(SEC ID N°: 37)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'; ARC342, 5'-(SEC ID N°: 55)-PEG-(SEC ID N°: 37)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'; ARC344, 5'-(SEC ID N°: 56)-PEG-(SEC ID N°: 37)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'; ARC345, 5'-(SEC ID N°: 36)-PEG-(SEC ID N°: 57)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'; (ARC346, 5'-(SEC ID N°: 36)-PEG-(SEC ID N°: 58)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'; ARC347, 5'-(SEC ID N°: 59)-PEG-(SEC ID N°: 60)-PEG-(SEC ID N°: 61)-[3'T]-3'; ARC362, 5'-(SEC ID N°: 36)-PEG-(SEC ID N°: 37)-PEG-(SEC ID N°: 62)-[3'T]-3'; ARC363, 5'-(SEC ID N°: 63)-PEG-(SEC ID N°: 37)-PEG-(SEC ID N°: 64)-[3'T]-3'; ARC364, 5'-(SEC ID N°: 50)-PEG-(SEC ID N°: 43)-PEG-(SEC ID N°: 65)-[3'T]-3'; ARC365, 5'-NH<sub>2</sub>-(SEC ID N°: 39)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'; ARC366, 5'-(SEC ID N°: 66)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 65)-[3'T]-3'; ARC404, 5'-(SEC ID N°: 55)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'; ARC405, 5'-(SEC ID N°: 56)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'; ARC406, 5'-(SEC ID N°: 39)-PEG-(SEC ID N°: 57)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'; ARC407, 5'-(SEC ID N°: 39)-PEG-(SEC ID N°: 58)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'; ARC408, 5'-(SEC ID N°: 39)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 62)-[3'T]-3'; ARC409, 5'-(SEC ID N°: 39)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 67)-[3'T]-3'; ARC410, 5'-(SEC ID N°: 39)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 68)-[3'T]-3'; ARC513 (5'-(SEC ID N°: 69)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 70)-[3'T]-3'), ARC514 (5'-(SEC ID N°: 69)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 71)-[3'T]-3'), ARC515 (5'-(SEC ID N°: 69)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 72)-[3'T]-3'), y ARC516 (5'-(SEC ID N°: 69)-PEG-(SEC ID N°: 40)-PEG-(SEC ID N°: 73)-[3'T]-3'), y finalmente una composición de todo 2'-O-metilo (ARC300 (o 300B), 5'-(SEC ID N°: 45)-PEG-(SEC ID N°: 46)-PEG-(SEC ID N°: 47)-[3'T]-3'). Otras variantes de composición incluyen: ARC276, 5'-(SEC ID N°: 36)-PEG-(SEC ID N°: 37)-PEG-(SEC ID N°: 38)-[3'T]-3'; ARC335, 5'-(SEC ID N°: 48)-PEG-(SEC ID N°: 43)-PEG-(SEC ID N°: 49)-[3'T]-3'; ARC336, 5'-(SEC ID N°: 50)-PEG-(SEC ID N°: 43)-PEG-(SEC ID N°: 51)-[3'T]-3'; ARC343, 5'-(SEC ID N°: 52)-PEG-(SEC ID N°: 43)-PEG-(SEC ID N°: 41)-[3'T]-3'.

**[0289]** La siguiente Tabla 2 resume la secuencia y composición de todas las variantes de ARC126 sintetizadas y probadas. Las secuencias mostradas se enumeran 5'→ 3' de derecha a izquierda en la tabla. La Tabla 2 también resume la identidad de composición, afinidad media y la actividad de todas las variantes de ARC 126 sintetizadas y probadas en ensayos *in vitro* (ensayo de unión competitiva y ensayo de proliferación de 3T3) descritos más adelante en el Ejemplo 5. En la tabla, d= residuo desoxi; f = residuo 2'-flúor; m = residuo 2'-O-metilo; PEG = espaciador de polietilenglicol (PEG-6); 3T = desoxi-timidina invertida.

Tabla 2. Secuencia y composición de variantes de ARC126.

| Nº de ARC | Secuencia modificada en 5'                                                                                               | Actividad | Actividad | Actividad |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 127       | PEG43K: GC AA CG CG GC GU GA CC mG PEG-CC CG GT CA mG GA mG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                  | +++       | 0.123     | 20.6967   |
| 124       | GC AA CC GA CG CG GC GT GA CC CG CG CC CA CG CG GT GA CG GA CG GC GA AT CC CA CG CC CA AT CG GA AT CC CG AT CG AT CG -3T | +++       | 0.21      | 3.45      |
| 276       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA mG GA mG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       | 0.23      | 1E        |
| 277       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA mG GA mG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       | 0.1       | 0.66967   |
| 293       | GC AA CG CG GC GT GA CC CG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       | 2.1       | 1000      |
| 300       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA mG GA mG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +         |           | 900       |
| 325       | GA CC GA CG CG GC GT GA CC CG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                       | ++        | 0.13      | 90        |
| 326       | GC AA CG CG GC GT GA CC CG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +         | 1.6       | 196.6967  |
| 337       | GC AA CG CG GC GT GA CC CG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | -         | 1         | 1000      |
| 338       | mC mA mG mG mC mU mA mC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | -         | 15        | 1000      |
| 339       | GC AA CG CG GC GT GA CC CG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | -         | 0.67      | 786.6967  |
| 340       | GC AA CG CG GC GT GA CC CG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | -         | 0.75      | 866.6967  |
| 341       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | -         | 24        | 1000      |
| 343       | mC mA mG mG mC mU mA mC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | NA        |           |           |
| 342       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | -         | 3.7       | 1000      |
| 344       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | -         | 1.7       | 200       |
| 345       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       | 0.52      | 13        |
| 346       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       | 0.37      | 15        |
| 347       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | -         | >1000     | 1000      |
| 352       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +         |           | 375       |
| 353       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | ++++      |           | 3.92333   |
| 354       | GC AA CG CG GC GT GA CC CG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +         |           | :719      |
| 355       | HMZ: GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                     | +++       |           | 6.79333   |
| 356       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       |           | 5.535     |
| 404       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | ++++      |           | 3.99      |
| 405       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       |           | 8.55333   |
| 406       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       |           | 17.15     |
| 437       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       |           | 16.36     |
| 438       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       |           | 28.4      |
| 439       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       |           | 7.31333   |
| 410       | GC AA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                          | +++       |           | 6.79      |
| 513       | GC CC GC GA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                    | ++++      | 0.14      | 2.025     |
| 514       | GC CC GC GA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                    | ++++      | 0.13      | 3.165     |
| 515       | GC CC GC GA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                    | ++++      | 0.22      | 4.665     |
| 516       | GC CC GC GA CG CG GC GT GA CC mG PEG-CC CG GT CA CG GA CG GC GA AU UC mA PEG-AT CG CA AT CC UC mG -3T                    | ++++      | 0.14      | 3.045     |

[0290] Tras la síntesis, estas variantes de composición se probaron en ensayos de unión bioquímica y de proliferación basada en células *in vitro* descritos en este documento. Estos experimentos mostraron un amplio intervalo de afinidades en ensayos de unión por competencia *in vitro* y un intervalo similarmente amplio de actividades en ensayos de proliferación basada en células (los resultados se describen más adelante). Las variantes de composición que mostraron los mayores niveles de afinidad de unión y actividad en el ensayo basado en células se ejemplifican por la serie ARC513-516 mostrada en la Figura 9B. La Figura 9B muestra las variantes de composición óptimas de ARC 126: ARC513 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N°: 70)-[3'T]-3'), ARC514 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N°: 71)-[3'T]-3'), ARC515 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N°: 72)-[3'T]-3'), y ARC516 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N°: 73)-[3'T]-3'). De la Figura 9B, todas las variantes de composición óptimas consisten en un tallo extendido, con respecto a ARC126, por dos pares de bases, y en los tallos superiores, un conjunto común de sustituciones puntuales de residuos 2'-flúor por 2'-O-metilo, además de los residuos 2'-O-metilo preexistentes de ARC126. Las variantes de composición ARC513-516 sólo se diferencian en dos aspectos: (1) la identidad de desoxi o 2'-flúor de los tres residuos de guanosina en el extremo 3' en el tallo central; y (2) la identidad de desoxi o 2'-O-metilo del residuo de citosina en la parte superior del tallo central en el lado 3'.

[0291] La afinidad de unión *in vitro* de las variantes de composición óptimas para PDGF se muestra en la Figura 10A. Los datos mostrados en la figura se derivaron de un ensayo de unión competitiva en el que la concentración indicada de aptámero competidor sin marcar se valoró en reacciones separadas contra una cantidad fija (<0,1 nM) del aptámero ARC 126 radiomarcado con <sup>32</sup>P en tampón que contiene una cantidad fija (0,1 nM) de la diana relacionada con el aptámero (PDGF-BB; PeproTech, Rocky Hill, NJ). ARC 126 se radiomarcó en el extremo 5' por incubación con <sup>32</sup>P-ATP (MP Biomedicals, Irvine, CA) y cinasa de polinucleótido (New England Biolabs ("NEB"), Beverly, MA). Las reacciones de unión se llevaron a cabo en solución salina tamponada con fosfato (Cellgro, Herndon, VA) que contenía 0,2 mg/ml de albúmina de suero bovino (NEB) y 0,02 mg/ml de ARNt (Sigma, St. Louis, MO). Las reacciones se equilibraron durante un periodo de 15 - 30 minutos a temperatura ambiente, luego se filtraron a través de un sándwich de membranas de nitrocelulosa (membrana Protra, Perkin-Elmer, Boston, MA) y nailon (membrana Hybond, Amersham, Piscataway, NJ) para separar el aptámero unido a diana del aptámero libre. El posterior análisis autorradiográfico de las membranas de filtro correspondientes a cada concentración de aptámero sin marcar reveló el grado de desplazamiento competitivo de <sup>32</sup>P-ARC126 por aptámero sin marcar. Los datos se muestran en la Figura 10A en la que ARC128 ((5'-(SEC ID N°: 4)-HEG-(SEC ID N°: 5)-HEG-(SEC ID N°: 6)-3')) representa una secuencia de control negativo y, por tanto, la variante inactiva de ARC126.

[0292] La Figura 10B muestra datos del ensayo de proliferación basada en células 3T3 *in vitro* que muestran la actividad de algunas variantes de composición de ARC126. Las células 3T3, una línea de células de fibroblastos de rata (ATCC, Manassas, VA), se sembraron a 3.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos un día antes del inicio del ensayo en 100 ul de DMEM/SBF al 10%. Al día siguiente, las células se lavaron una vez con DMEM lineal y luego se añadieron 75 ul de DMEM/SBF al 0,8% a cada pocillo. Luego se añadieron 25 ul de PDGF-BB (PeproTech,

Rocky Hill, NJ) a una concentración final de 50 ng/ml +/- de variantes de ARC126 (6 puntos, concentración final 0-200 nM) a cada pocillo. Las células se incubaron durante 3 días. Tras la incubación se añadieron 10 ul de MTT (Promega, Madison, WI) a cada pocillo y se incubaron durante 1,5 horas adicionales. Entonces se eliminó el medio, se añadieron 200 ul de isopropanol (2-propanol) a cada pocillo, las células se volvieron a suspender meticulosamente y la absorbancia a 570 nm se leyó en un lector de placas de 96 pocillos. Como se muestra en la Figura 10B, es evidente que (1) todas las variantes de composición mostradas son activas; y (2) la clasificación de actividad relativa de ARC513 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N°: 70)-[3'T]-3'), ARC514 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N°: 71)-[3'T]-3'), ARC515 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N°: 72)-[3'T]-3') y ARC516 (5'-(SEC ID N°: 69)- PEG -(SEC ID N°: 40)- PEG -(SEC ID N°: 73)-[3'T]-3') es similar.

### Ejemplo 3B: Modificaciones de ARC513

#### Sustituciones de mU

**[0293]** ARC513 se modificó adicionalmente para sustituir los espaciadores de PEG en 3' o 5' con tribucles de 2'-OMe o tetrabucles de 2'-OMe, resultando los siguientes aptámeros:

#### **[0294]**

ARC1012 NH<sub>2</sub>-

(dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmGmUmUmUdCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmA) (SEQ ID NO:86)-PEG-(TdGdATmCdCTmGmGmG) (SEQ ID NO:87)-3T

#### **[0295]**

ARC1013 NH<sub>2</sub>-

(dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmGmUmUmUmUdCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmA) (SEQ ID NO:88)-PEG- (TdGdATmCdCTmGmGmG) (SEQ ID NO:87)-3T

#### **[0296]**

ARC1014 NH<sub>2</sub>-(dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG) (SEQ ID NO:89)-PEG-

dCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmAmUmUmUTdGdATmCdCTmGmGmG (SEQ ID NO:91)-3T

#### **[0297]**

ARC1015 NH<sub>2</sub>-(dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG) (SEQ ID NO: 89)-PEG-

(dCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmAmUmUmUmUTdGdATmCdCTmGmGmG) (SEQ ID NO:93)-3T

#### **[0298]**

ARC1016 NH<sub>2</sub>-

dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmGmUmUmUdCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmAmUmUmUTdGdATmCdCTmGmGmG-3T (SEQ ID NO: 94)

#### **[0299]**

ARC1017 NH<sub>2</sub>-

dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmGmUmUmUmUdCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmAmUmUmUmUTdGdATmCdCTmGmGmG-3T (SEQ ID NO: 95)

Ensayo de proliferación de 3T3 con aptámeros ARC513 modificados

5 **[0300]** Células 3T3, que se derivan de una línea de células de fibroblastos de rata (ATCC, Manassas, VA), se usaron en un ensayo de proliferación para probar la potencia de aptámeros ARC513 modificados. Las células de fibroblastos 3T3 tienen receptores de PDGF en su superficie celular y responden a mitógeno, por ejemplo, estimulación de PDGF por proliferación. El ensayo se realizó del siguiente modo: células 3T3 se sembraron a 3.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos un día antes del inicio del ensayo en 100  $\mu$ l de DMEM/SBF al 10%. Al día siguiente, las células se lavaron una vez con DMEM lineal y luego se añadieron 75  $\mu$ l de DMEM/SBF al 0,8% a cada pocillo. Luego se añadieron 25  $\mu$ l de PDGF-BB (PeproTech, Rocky Hill, NJ) a una concentración final de 50 ng/ml a cada pocillo +/- condición de aptámero que iba a probarse. Cada placa incluyó las siguientes condiciones por triplicado: sin PDGF que se corresponde con crecimiento sin mitógeno (control negativo), un control de aptámero de control negativo (ARC128) en el que no se observa efecto sobre la tasa de crecimiento (control negativo), un control positivo en el que se observa el máximo crecimiento en ausencia de aptámero de PDGF y una serie de diluciones de aptámero de PDGF funcional a partir de las cuales podría calcularse una buena curva de  $CI_{50}$ . Las diluciones de aptámero de PDGF funcional normalmente consistieron en 6 puntos en diluciones dobles seriadas.

20 **[0301]** Las células se incubaron durante 3 días. Tras la incubación se añadieron 10  $\mu$ l de MTT (Promega, Madison, WI) a cada pocillo y se incubaron durante 1,5 horas adicionales. El medio se eliminó, se añadieron 200  $\mu$ l de isopropanol (2-propanol) a cada pocillo, las células se resuspendieron meticulosamente y la absorbancia a 570 nm se leyó en un lector de placas de 96 pocillos. El presente ejemplo representa la comparación de la potencia del aptámero de PDGF ARC513 con la de 3 variantes de ARC 513.

25 **[0302]** El ensayo de proliferación de células 3T3 se realizó con ARC513 y derivados de ARC 513, ARC1012 a ARC1017. ARC513 mostró rutinariamente valores de  $CI_{50}$  <10 nM en el que ARC 128 de control negativo nunca mostró un efecto sobre la proliferación de células 3T3 (datos de ARC128 no mostrados). La siguiente Tabla 3A muestra las  $CI_{50}$  de variantes de ARC513 en el ensayo de proliferación de 3T3.

30 **Tabla 3A:** Variantes de ARC513 en el ensayo de proliferación de 3T3.

| Nº de ARC | $CI_{50}$ media |
|-----------|-----------------|
| 513       | 3,7             |
| 1012      | 2,79            |
| 1013      | 15,4            |
| 1014      | 10,61           |
| 1015      | 10,1            |
| 1016      | 8,5             |
| 1017      | 14,3            |

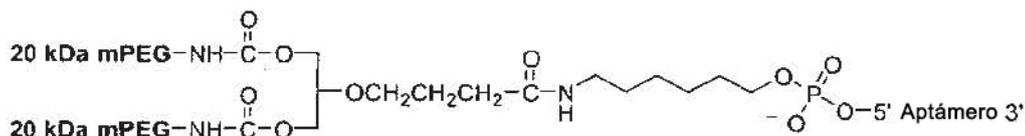
Conjugación de ARC 513-5'-PEG

35 **[0303]** El oligonucleótido 5'-NH<sub>2</sub>-dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG (SEC ID N° 69) PEG dCdGtAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N° 40) PEG TdGdATmCdCTmGmGmG-3T-'3 (SEC ID N° 70) se sintetizó en un sintetizador AKTA OligoPilot 100 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) según los procedimientos recomendados por el fabricante usando 2'-OMe-ARN comercialmente disponible convencional, desoxi-inosina y ADN-fosforamiditas (Glen Research, Sterling, VA) y un soporte de CpG de desoxi-timidina invertida. Una función amina terminal se unió con un modificador de 5'-amino C6-TFA (Glen Research, Sterling, VA). Después de la desprotección, el oligonucleótido se purificó por cromatografía de intercambio iónico en la resina Super Q 5PW (30) (Tosoh Biosciences) y se precipitó con etanol.

45 **[0304]** Alícuotas del aptámero modificado con 5'-amina se conjugaron pos-sintéticamente con un resto de PEG de 30 kDa lineal, de 20 kDa lineal y de 40 kDa tanto ramificado como lineal. Los aptámeros se disolvieron en una disolución de agua/DMSO (1:1) a una concentración entre 1,5 y 3 mM. Se añadió tampón carbonato sódico, pH 8,5, a una concentración final de 100 mM, y el oligonucleótido se hizo reaccionar durante la noche con un exceso 1,7 molar del reactivo de PEG deseado (por ejemplo, éster de p-nitrofenilcarbonato Sunbright MENP-20T de 20 kDa [NOF Corp, Japón], éster de p-nitrofenilcarbonato Sunbright MENP-30T de 30 kDa [NOF Corp, Japón], éster de p-nitrofenilcarbonato Sunbright GL2-400NP [NOF Corp, Japón], mPEG2-éster de NHS de 40 kDa o 60 kDa [Nektar, Huntsville AL]) disuelto en un volumen igual de acetonitrilo. Los productos PEGilados resultantes se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en la resina Super Q 5PW (30) (Tosoh Biosciences) y se desalaron usando cromatografía de fase inversa realizada en la resina Amberchrom CG300-S (Rohm and Haas) y se liofilizaron.

55 **[0305]** Las estructuras de los aptámeros PEGilados resultantes se facilitan a continuación:

ARC594:



en la que

5 Aptámero = dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG (SEC ID N° 69) – PEG - dCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N° 40) - PEG - TdGdATmCdCTmGmGmG-3T-3' (SEC ID N° 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, PEG denota un espaciador de PEG y 3T denota una tapa de desoxi-timidina invertida.

ARC1472:

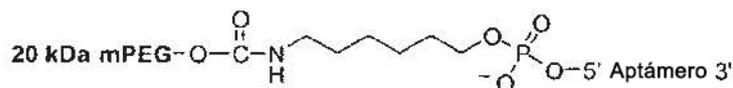


10 en la que

Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG (SEC ID N° 69) - PEG - dCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N° 40) - PEG - TdGdATmCdCTmGmGmG-3T-3' (SEC ID N° 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, PEG denota un espaciador de PEG y 3T denota una tapa de desoxi-timidina invertida.

15

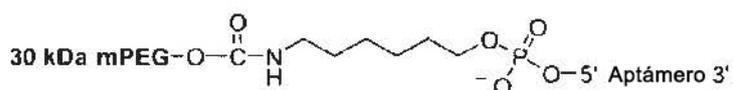
ARC592:



en la que

20 Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG (SEC ID N° 69) - PEG - dCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N° 40) – PEG - TdGdATmCdCTmGmGmG-3T-3' (SEC ID N° 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, PEG denota un espaciador de PEG y 3T denota una tapa de desoxi-timidina invertida.

ARC593:



25

en la que

30 Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG (SEC ID N°: 69) - PEG - dCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N°: 40) - PEG - TdGdATmCdCTmGmGmG-3T-3' (SEC ID N°: 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, PEG denota un espaciador de PEG y 3T denota una tapa de desoxi-timidina invertida.

#### Conjugados de aptámero-3'-5'-PEG

35 **[0306]** El oligonucleótido 5'-NH<sub>2</sub>-dCdCdCdAdGdGdCdTAdCmG (SEC ID N° 69) PEG dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N° 40) PEG dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG-NH<sub>2</sub>-3' (SEC ID N° 102) se sintetizó en un sintetizador AKTA OligoPilot 100 (GE Healthcare Uppsala, Suecia) según los procedimientos recomendados por el fabricante usando 2'-OMe-ARN comercialmente disponible convencional, desoxi-inosina y ADN-fosforamiditas (Glen Research, Sterling, VA) y un soporte de modificador de 3'-ftalimida-amino C6 CPG (Glen Research, Sterling, VA). Las funciones de la amina terminal se unieron a un modificador de 5'-amino C6-TFA (Glen Research, Sterling, VA). Después de la desprotección, los oligonucleótidos se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en la resina Super Q 5PW (30) (Tosoh Biosciences) y se precipitaron con etanol.

45 **[0307]** Alícuotas del aptámero modificado con 3'-5'-diamina se conjugaron con diferentes restos de PEG pos-sintéticamente. Los aptámeros se disolvieron en una disolución de agua/DMSO (1:1) a una concentración entre 1,5 y 3 mM. Se añadió tampón carbonato sódico, pH 8,5, a una concentración final de 100 mM y el oligonucleótido se hizo reaccionar durante la noche con un exceso 2,7 molar del reactivo de PEG deseado (por ejemplo, éster de p-nitrofenilcarbonato Sunbright MENP-20T de 20 kDa [NOF Corp, Japón], éster de p-nitrofenilcarbonato Sunbright

MENP-30T de 30 kDa [NOF Corp, Japón]) disuelto en un volumen igual de acetonitrilo. Los productos PEGilados de 2 x 20 kDa o 2 x 30 kDa resultantes se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en la resina Super Q 5PW (30) (Tosoh Biosciences) y se desalaron usando cromatografía de fase inversa realizada en la resina Amberchrom CG300-S (Rohm and Haas) y se liofilizaron.

5

**[0308]** Las estructuras de los aptámeros di-PEGilados resultantes se facilitan a continuación:

ARC1473:



10 en la que

Aptámero = dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG (SEC ID N° 69) – PEG - dCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N° 40) – PEG - TdGdATmCdCTmGmGmG-3' (SEC ID N° 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido y PEG denota un espaciador de PEG.

15

ARC1474:



en la que

20 Aptámero = dCdCdCdAdGdGdCTdAdCmG (SEC ID N° 69) – PEG - dCdGTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N° 40) – PEG - TdGdATmCdCTmGmGmG-3' (SEC ID N° 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido y PEG denota un espaciador de PEG.

#### 25 Ensayo de proliferación de 3T3 con variantes de ARC513 conjugadas con PEG

**[0309]** El ensayo de proliferación de 3T3 previamente descrito se usó para probar la potencia de todas las variantes de ARC513 conjugadas con PEG descritas inmediatamente antes. El ensayo se realizó del siguiente modo: células 3T3 se sembraron a 3.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos un día antes del inicio del ensayo en 100 ul de DMEM/SBF al 10%. Al día siguiente, las células se lavaron una vez con DMEM lineal y luego se añadieron 75 ul de DMEM/SBF al 0,8% a cada pocillo. Luego se añadieron 25 ul de PDGF-BB (PeproTech, Rocky Hill, NJ) a una concentración final de 50 ng/ml a cada pocillo +/- condición de aptámero que iba a probarse. Cada placa incluyó las siguientes condiciones por triplicado: sin PDGF que se corresponde con crecimiento sin mitógeno (control negativo), un control de aptámero de control negativo (ARC128) en el que no se observa efecto sobre la tasa de crecimiento (control negativo), un control positivo en el que se observa el máximo crecimiento en ausencia de aptámero de PDGF y una serie de diluciones de aptámero de PDGF funcional a partir de las cuales podría calcularse una buena curva de  $CI_{50}$ . Las diluciones de aptámero de PDGF funcional normalmente consistieron en 6 puntos en diluciones dobles seriadas.

**[0310]** Las células se incubaron durante 3 días. Tras la incubación se añadieron 10 ul de MTT (Promega, Madison, WI) a cada pocillo y se incubaron durante 1,5 horas adicionales. El medio se eliminó, se añadieron 200 ul de isopropanol (2-propanol) a cada pocillo, las células se resuspendieron meticulosamente y la absorbancia a 570 nm se leyó en un lector de placas de 96 pocillos. El presente ejemplo representa la comparación de la potencia del aptámero de PDGF ARC513 con la de los aptámeros ARC513 PEGilados.

**[0311]** El ensayo de proliferación de células 3T3 se realizó con ARC513 y con todos los aptámeros ARC513 conjugados con PEG que se sintetizaron como se ha descrito inmediatamente antes. ARC513 mostró rutinariamente valores de  $CI_{50}$  <10 nM cuando el ARC128 de control negativo nunca mostró un efecto sobre la proliferación de células 3T3 (datos de ARC128 no mostrados). Las siguientes Tablas 3B y 3C muestran las  $CI_{50}$  de ARC513 en comparación con los aptámeros ARC513 conjugados con PEG en el ensayo de proliferación de 3T3.

50

**Tabla 3B:** Variantes de ARC513 en el ensayo de proliferación de 3T3.

| N° de ARC | $CI_{50}$ media |
|-----------|-----------------|
| 513       | 3,7             |
| 594       | 1,95            |
| 1472      | 2,43            |
| 1473      | 3,42            |
| 1474      | 3,32            |

**Tabla 3C:** Variantes de ARC513 en el ensayo de proliferación de 3T3.

| Nº de ARC | CI <sub>50</sub> media |
|-----------|------------------------|
| 513       | 3,2                    |
| 592       | 0,88                   |
| 593       | 1,45                   |

Ejemplo 3C: Optimización de propiedades farmacocinéticas y de biodistribución de ARC126 *in vivo*

5 **[0312]** Además de la optimización de la composición de la secuencia de ARC126 con respecto al ensayo de afinidad de unión a diana y de actividad basado en células *in vitro* se desean optimizar las propiedades de semivida farmacocinética (PK) *in vivo*,  $t_{1/2}$  y biodistribución de la composición (composiciones) de secuencia óptima para los aptámeros anti-PDGF previamente descritos. Esta modulación de las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución de una composición de aptámero puede llevarse a cabo (véase nº de serie de EE.UU. 10/718.833 presentada el 21 de noviembre de 2003 y nº de serie de EE.UU. 60/550.790 presentada el 5 de marzo de 2004) por conjugación del extremo 3' o 5', o un sitio o sitios internos, de la molécula con una cadena o cadenas de polietilenglicol (PEG), es decir, PEGilación (el intervalo es ~2 kDa a 100 kDa, con PEG típicos que tienen pesos moleculares de 2 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa). Obsérvese que para cada estudio farmacocinético descrito en este documento, todos los datos de concentración basados en masa sólo se refieren al peso molecular de la porción de oligonucleótido del aptámero, independientemente de la masa conferida por la conjugación con PEG.

20 **[0313]** Con el fin de establecer la viabilidad del uso de una composición de secuencia de aptámero PEGilado dada fue necesario confirmar que la PEGilación putativa no interfería significativamente con la actividad del aptámero en ensayos de unión *in vitro* y de proliferación basada en células. Los ensayos de unión competitiva se realizaron y se analizaron como se describe en este documento, excepto que se usó NH<sub>2</sub>-ARC126 marcado con 3'-<sup>32</sup>P en vez de 5'-<sup>32</sup>P-ARC126 (la secuencia de nucleótidos de ARC 126 incorpora una timidina inversa en el extremo 3', que es un sustrato para la reacción de radiomarcado catalizada por cinasa de polinucleótido).

25 **[0314]** La Figura 11A es un gráfico de datos del ensayo de unión por competencia para ARC 126 y dos variantes que están conjugadas en 5' con grupos PEG de 30 kDa (ARC308) y 40 kDa (ARC127). La Figura 11B muestra datos del ensayo de proliferación basada en células 3T3 *in vitro* para ARC126 en función de la conjugación con el grupo PEG en 5' (ARC126 + 30 kDa = ARC308 y ARC126 + PEG de 40 kDa = ARC 127). Los datos mostrados en la Figura 11B demuestran que la conjugación en 5' de ARC126 con grupos PEG de 30k Da y 40 kDa parece conducir a una ligera disminución en la actividad *in vitro* del aptámero, el efecto de la presencia de los grupos PEG es inferior a dos veces con respecto al aptámero sin PEGilar, ARC126. Los datos mostrados en la Figura 11B también demuestran que la conjugación en 5' de ARC126 con grupos PEG de 30 kDa y 40 kDa no reduce significativamente la actividad *in vitro* en el ensayo de proliferación de 3T3 del aptámero con respecto a la composición de ARC 126.

35 **[0315]** La Figura 12A muestra el perfil farmacocinético *in vivo* de ARC126 en función de la conjugación con grupos PEG en 5'. Los estudios se hicieron en ratones CD-1 como se describe en el Ejemplo 10 (Charles River Labs, Wilmington, MA). De la figura es evidente que la semivida de eliminación terminal,  $t_{1/2}$ , está fuertemente afectada por el tamaño del grupo PEG en 5' conjugado con el aptámero.

40 **[0316]** Los datos farmacocinéticos (PK) mostrados en la Figura 12A se sometieron a análisis no compartimental (NCA) usando el paquete de software convencional en la industria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). La siguiente Tabla 4 enumera los parámetros farmacocinéticos (PK) *in vivo* derivados de NCA primarios para ARC126 + grupos PEG de 20 kDa (ARC240), +30 kDa (ARC308) y +40 kDa (ARC127) después de la administración intravenosa (IV) a 10 mg/kg en ratones. Los datos mostrados en la Tabla 4 demuestran que la semivida de eliminación farmacocinética *in vivo*,  $t_{1/2}$ , de ARC 126 se modula 4 veces cambiando el tamaño del grupo PEG en 5' conjugado con el aptámero afectado por el tamaño del grupo PEG en 5' conjugado con el aptámero de 20 kDa a 40 kDa. La Figura 12B muestra el perfil farmacocinético *in vivo* de ARC 127 (ARC126 + PEG de 40 kDa) después de la administración intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) y subcutánea (SC) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones. Los datos farmacocinéticos (PK) mostrados en la Figura 12B se sometieron a análisis no compartimental (NCA) usando el paquete de software convencional en la industria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

**Tabla 4.** Análisis no compartimental farmacocinético de conjugados en 5' de ARC126

|               | PEG  | C <sub>máx</sub> , nM | ABC, nM·h | t <sub>máx</sub> (h) | MRT (h) | t <sub>1/2</sub> (h) | V (ml/kg) |
|---------------|------|-----------------------|-----------|----------------------|---------|----------------------|-----------|
| <b>ACR240</b> | 20 K | 34317                 | 0,5       | 39277                | 1,16    | 0,94                 | 0,3       |
| <b>ACR308</b> | 30 K | 27659                 | 1,0       | 64867                | 2,14    | 1,67                 | 0,3       |
| <b>ACR127</b> | 40 K | 60964                 | 2,0       | 344356               | 5,08    | 6,84                 | 0,1       |

Parámetros farmacocinéticos (análisis no compartimental) de conjugados en 5' de ARC126: ARC240 = ARC126 + PEG de 20 kD; ARC308 = ARC126 + PEG de 30 kD; y ARC127 = ARC126 + PEG de 40 kD después de la administración IV a 10 mg/kg en ratones.

5 **[0317]** La Tabla 5 a continuación enumera los parámetros farmacocinéticos (PK) *in vivo* derivados de NCA primarios para ARC 126 + PEG de 40 kDa en función de la vía de la administración a 10 mg/kg en ratones. Los datos farmacocinéticos (PK) mostrados en la Figura 12B se sometieron a análisis no compartimental (NCA) usando el paquete de software convencional en la industria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

10 **Tabla 5.** Perfil farmacocinético de ARC127 (ARC126 + PEG de 40 kD)

|           | <b>C<sub>máx</sub>, nM</b> | <b>t<sub>máx</sub> (h)</b> | <b>ABC, (h nM)</b> | <b>MRT (h)</b> | <b>t<sub>1/2</sub> (h)</b> | <b>V (l/kg)</b> | <b>Biodisponibilidad F</b> |
|-----------|----------------------------|----------------------------|--------------------|----------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|
| <b>IV</b> | 29711,6                    | 2                          | 229686,8           | 6,573          | 8,602                      | 0,053           | 1,000                      |
| <b>IP</b> | 12756,0                    | 8                          | 143605,5           | 11,231         | 7,856                      | 0,078           | 0,625                      |
| <b>SC</b> | 3176,7                     | 8                          | 55030,91           | 16,632         | 9,176                      | 0,238           | 0,240                      |

Administración pos-intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) y subcutánea (SC) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones

15 **[0318]** De los datos mostrados en la Figura 12B, dos puntos primarios son evidentes: (1) la farmacocinética de ARC127 (ARC126 + PEG de 40 kD) después de la administración intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones a una concentración en plasma de ~1 µM está presente 24 h después de la dosis; y (2) la biodisponibilidad sistémica, F, de ARC127 después de la administración intraperitoneal (IP) es bastante alta (~63%), mientras que para la administración subcutánea (SC) la biodisponibilidad todavía es suficientemente alta (~24%) para garantizar la consideración para aplicaciones clínicas.

20 **[0319]** Como prueba secundaria de tanto la farmacocinética en plasma como la bioactividad *in vivo* de ARC127 (ARC126 + PEG de 40 kD), el ensayo de unión por competencia descrito anteriormente en referencia a la Figura 10A se usó para ensayar las mismas muestras de plasma usadas para generar los datos mostrados en la Figura 12B. Se prepararon disoluciones 1:10 en serie de muestras de plasma en solución salina tamponada con fosfato (1X PBS) y se mezclaron con una concentración fija de <sup>32</sup>P-ARC126, luego se añadieron a PDGF-BB humano. La concentración final de PDGF en cada ensayo fue 0,1 nM, y la concentración final de <sup>32</sup>P-ARC126 < 0,1 nM. En este experimento, las muestras de plasma se analizaron comparando con una curva patrón generada con muestras de concentraciones de ARC127 conocidas en 1X PBS. Comparando con los patrones de referencia, la concentración eficaz de aptámero activo podría calcularse en cada muestra de plasma. La concentración eficaz de aptámero activo, como se calcula usando los resultados del análisis del ensayo de unión por competencia de las muestras PK de plasma, se muestra en la Figura 12C. La Figura 12C muestra el perfil de bioactividad de ARC126 + PEG de 40 kD después de la administración intravenosa (IV) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones. Por tanto, este análisis *ex vivo* proporciona la verificación de que (1) el aptámero estaba presente y era activo en el plasma del modelo de ratón a t = 48 h después de la dosis; y (2) las concentraciones en plasma calculadas a partir del ensayo farmacocinético basado en fluorescencia son precisas.

#### 40 EJEMPLO 4: Reactividad cruzada de especies de ARC126 y ARC127

**[0320]** Se realizaron estudios para determinar qué isoformas de PDGF se unirían a ARC126. Los ensayos de unión por competencia se establecieron usando el análisis de transferencia puntual previamente descrito para probar ARC126 para la unión a PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB humanos (todos de PeproTech, Rocky Hill, NJ). Los resultados del ensayo de unión por competencia muestran que ARC126 (SEC ID N° 1-HEG-SEC ID N°: 2-HEG-SEC ID N°: 3-3T) se une a PDGF-BB con una K<sub>d</sub> de aproximadamente 100 pM, y PDGF-AB con una K<sub>d</sub> de aproximadamente 100 pM, pero no se une a PDGF-AA (Figura 13A). A continuación se hizo un estudio para determinar si ARC126 reaccionaba de forma cruzada con PDGF-BB de especies distintas de ser humano. Los ensayos de unión por competencia se establecieron por análisis de transferencia puntual, como se describe previamente, usando PDGF-BB humano, de rata y de ratón (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Los resultados del ensayo de unión por competencia muestran que ARC126 se une a PDGF-BB humano, de rata y de ratón con igual afinidad (Figura 13B).

#### 50 EJEMPLO 5: Ensayo de proliferación de células 3T3

55 **[0321]** Como se mostró que ARC126 reaccionaba de forma cruzada con PDGF-BB humano, de rata y de ratón, las células 3T3, que se derivan de una línea de células de fibroblastos de rata (ATCC, Manassas, VA), podrían usarse en un ensayo de proliferación para probar la potencia de todos los aptámeros de PDGF, que incluyen aptámeros que se obtuvieron como parte de los esfuerzos de desfluoración descritos en el Ejemplo 3A. Las células de fibroblastos 3T3 tienen receptores de PDGF en su superficie celular y responden a mitógeno, por ejemplo, estimulación de PDGF por proliferación. El ensayo se realizó del siguiente modo: células 3T3 se sembraron a 3.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos un día antes del inicio del ensayo en 100 µl de DMEM/SBF al 10%. Al día

siguiente, las células se lavaron una vez con DMEM lineal y luego se añadieron 75 ul de DMEM/SBF al 0,8% a cada pocillo. Luego se añadieron 25 ul de PDGF-BB (PeproTech, Rocky Hill, NJ) a una concentración final de 50 ng/ml a cada pocillo +/- condición de aptámero que iba a probarse. Cada placa incluyó las siguientes condiciones por triplicado: sin PDGF que se corresponde con crecimiento sin mitógeno (control negativo), un control de aptámero negativo (ARC128) en el que no se observa efecto sobre la tasa de crecimiento (control negativo), un control positivo en el que se observa el máximo crecimiento en ausencia de aptámero de PDGF y una serie de diluciones de aptámero de PDGF funcional a partir de las cuales podría calcularse una buena curva de  $CI_{50}$ . Las diluciones de aptámero de PDGF funcional normalmente consistieron en 6 puntos en diluciones dobles seriadas.

5  
10  
15  
[0322] Se incubaron células durante 3 días. Tras la incubación se añadieron 10 ul de MTT (Promega, Madison, WI) a cada pocillo y se incubaron durante 1,5 horas adicionales. El medio se eliminó, se añadieron 200  $\mu$ l de isopropanol (2-propanol) a cada pocillo, las células se resuspendieron meticulosamente y la absorbancia a 570 nm se leyó en un lector de placas de 96 pocillos. El presente ejemplo representa la comparación de la potencia del aptámero de PDGF ARC127 con la de un anticuerpo policlonal neutralizante de PDGF como se muestra en la Figura 14A (R & D Systems, Minneapolis, MN). Los datos mostrados en la Figura 14A demuestran que el aptámero muestra mejor potencia que el anticuerpo policlonal.

20  
[0323] El ensayo de proliferación de células 3T3 se realizó con ARC126, ARC127, ARC128 y con todos los otros derivados de aptámero de PDGF que se obtuvieron como se ha descrito en el Ejemplo 3A anterior. ARC126 y ARC127 muestran rutinariamente valores de  $CI_{50} < 20$  nM cuando ARC128 de control negativo nunca muestra un efecto de proliferación de células 3T3. La siguiente Tabla 6 muestra las  $CI_{50}$  de variantes de ARC126 en el ensayo de proliferación de 3T3.

25 **Tabla 6.**  $CI_{50}$  de variantes desfluoradas de ARC126 en el ensayo de proliferación de 3T3.

| Nº de ARC | $CI_{50}$ media |
|-----------|-----------------|
| 124       | 20,67           |
| 126       | 3,40            |
| 127       | 3,45            |
| 276       | 18,00           |
| 277       | 8,67            |
| 299       | 1000,00         |
| 300       | 900,00          |
| 335       | 90,00           |
| 336       | 196,67          |
| 337       | 1000,00         |
| 338       | 1000,00         |
| 339       | 766,67          |
| 340       | 866,67          |
| 341       | 1000,00         |
| 343       |                 |
| 342       | 1000,00         |
| 344       | 200,00          |
| 345       | 13,00           |
| 346       | 15,00           |
| 347       | 1000,00         |
| 362       | 315,00          |
| 363       | 3,92            |
| 364       | 1719,00         |
| 365       | 6,79            |
| 366       | 5,54            |
| 404       | 3,89            |
| 405       | 8,65            |
| 406       | 17,15           |
| 407       | 16,36           |
| 408       | 28,40           |
| 409       | 7,31            |
| 410       | 6,79            |
| 513       | 2,07            |
| 514       | 3,16            |
| 515       | 4,66            |
| 516       | 3,05            |
| 127       | 3,45            |

**[0324]** El aptámero de PDGF ARC127 también bloquea la proliferación de células 3T3 mejor que los inhibidores de tirosina cinasas conocidos tales como los compuestos AG 1295 y AG 1433 (Sigma Aldrich Biochemicals, St Louis, MO). Las condiciones de ensayo fueron exactamente las mismas que se han descrito anteriormente. ARC127 redujo el aumento accionado por PDGF en la proliferación a niveles de referencia a una concentración de tan sólo 30 nM. Ambos compuestos AG mostraron potencias mucho peores en comparación con ARC127. AG-1433 pareció tener efectos tóxicos no específicos a niveles micromolares. Este efecto es visible a partir de 300 nM cuando los niveles de la señal son menores que muestras solas sin tratamiento correspondientes a la pérdida de señal debido a la letalidad de células sólo en presencia del compuesto AG (Figura 14B).

#### 10 EJEMPLO 6: Ensayo de viabilidad de células 3T3

**[0325]** La reducción del crecimiento en células 3T3 observada en el ensayo de proliferación celular descrito en el Ejemplo 5 tras la adición de ARC126, ARC127 y otros derivados de aptámeros activos de PDGF podría ser posiblemente debida a efectos tóxicos del aptámero. Para probar esta posibilidad se realizó un ensayo de viabilidad celular en calceína AM (Molecular Probes, Eugene, OR). Las células 3T3 se sembraron a 3.000 células/pocillo, se trataron con diversas concentraciones de aptámero de PDGF hasta 40 µM, se probaron durante 24 y 48 horas. Se proporcionó TNF-α (100 pg/ml) y se usó como control positivo para inducir apoptosis. Tras la incubación, las células se lavaron con 1X PBS. La calceína AM se preparó según instrucciones recomendadas por el fabricante, se incubó durante 30 minutos y la señal de la intensidad de fluorescencia se determinó en un lector de placas de 96 pocillos. No se observó aumento en la tasa de apoptosis de células 3T3 debido a ARC127 (Figura 15).

#### 20 EJEMPLO 7: Ensayo de migración de células 3T3 o RPE

**[0326]** PDGF es un fuerte mitógeno, además de un factor quimiotáctico. Un ensayo de migración realizado tanto en forma de 24 como de 96 pocillos se eligió como ensayo funcional adicional para probar la potencia de ARC 127. En el ensayo de migración de células, 80.000 células de fibroblastos de rata 3T3 (ATCC, Manassas, VA) o de células RPE (epiteliales pigmentarias retinianas) (ATCC, Manassas, VA) se sembraron por pocillo en una placa de 24 pocillos con filtros de 8 micrómetros (BD Biosciences, Discovery Labware, Bedford, MA). A la cámara superior se añadieron 0,5 ml de DMEM/SBF al 0,2% y a la cámara inferior se añadieron 0,8 ml de DMEM/SBF al 0,2%. El sistema se equilibró incubando durante 4 horas a 37 grados Celsius. Se añadieron PDGF-BB humano (PeproTech, Rocky Hill, NJ) (para células RPE) o PDGF-BB de rata (PeproTech) (para células 3T3) a la cámara inferior (0 ng/ml – 100 ng/ml de concentración final). El sistema se incubó 4 horas a 12 horas. Las células se rasparon de la parte superior del filtro con Q-tip. Las células que migraron al fondo del filtro se fijaron con una mezcla de 50% de metanol frío/50% de acetona durante 3 minutos.

**[0327]** Tras la incubación, los filtros se lavaron con 1X PBS y se tiñeron con Giemsa Stain (Matheson Coleman and Bell) durante 1-2 horas y la migración se visualizó haciendo fotos en un microscopio Zeiss Axiovert 200M. Específicamente, la migración se visualizó bajo cuatro condiciones diferentes: (1) migración de referencia observada en ausencia de PDGF; (2) migración observada en presencia de PDGF-BB 5 nM; (3) migración observada en presencia de PDGF-BB 5 nM y aptámero funcional ARC127 100 nM; y (4) migración observada en presencia de PDGF-BB 5 nM y aptámero de control negativo ARC128 100 nM. Los resultados de la migración visualizada muestran que la presencia de ARC127 100 nM inhibe los efectos de PDGF-BB 5 nM, mostrados por la migración de células 3T3 o RPE a niveles de referencia. El control negativo ARC 128 no muestra actividad y la migración observada a esta condición es igual a la observada con PDGF-BB 5 nM solo.

**[0328]** La Figura 16A muestra los resultados de un experimento de migración de células realizado en forma de 96 pocillos usando el ensayo de migración en 96 pocillos QCM Chemotaxis (#ECM 510) (Chemicon, Temecula, CA). La forma de 96 pocillos permitió un análisis más cuantitativo de la migración de células que la forma de 24 pocillos, que fue más cualitativa. El ensayo en 96 pocillos empieza llevando las placas y los reactivos a temperatura ambiente. Se añadieron 150 ul de DMEM/DBF al 0,2% con o sin factor quimiotáctico a los pocillos de la bandeja alimentadora. Se añadieron 200.000 células RPE en 100 ul de medio DMEM/SBF al 0,2% a la cámara de migración y se incubaron durante 1-24 horas a 37 grados Celsius.

**[0329]** Tras la incubación, la placa de la cámara de migración se quitó y las células no migratorias se desecharon. El número de células migratorias se cuantificó según instrucciones recomendadas por el fabricante. En resumen, el medio del lado superior se eliminó tirando la suspensión de células restantes, y se colocó sobre una nueva bandeja alimentadora que contenía 150 ul de disolución de desprendimiento de células precalentada. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 grados Celsius. Se diluyó el colorante CyQuant GR 1:75 con 4X tampón de lisis y se añadieron 50 ul del tampón de lisis/disolución de colorante a cada pocillo que contenía 150 ul de la disolución que contenía células migratorias. Esta mezcla se incubó adicionalmente durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se transfirió a una placa de 96 pocillos nueva y se leyó a 480/520 nm de absorbancia en un lector de placas de 96 pocillos.

**[0330]** Los resultados obtenidos en este experimento de migración de células en forma de 96 pocillos (Figura 16A) confirmaron los experimentos de migración de células realizados en la forma de 24 pocillos. ARC127 redujo los niveles de migración a la referencia y el aptámero de control negativo no afectó la migración. La Figura 16B muestra

que la migración observada aumenta linealmente en función del número de células o concentración de mitógeno añadido.

#### EJEMPLO 8: Ensayo de crecimiento clonogénico

**[0331]** Se cultivaron células de glioblastoma U87 (ATCC) en presencia o ausencia de mitógeno, además de aptámero como se muestra en los paneles. Las células U87 se sembraron en DMEM/SBF al 10% al 50% de confluencia en placas de 100 mm. Las células se incubaron con PDGF-BB (PeproTech) +/- ARC127 hasta que las células aparecieron confluentes (1-2 días). La adición de una concentración final de 50 ng/ml de PDGF-BB solo produjo la aparición de agrupaciones de células tridimensionales altamente conectadas. La adición de 50 ng/ml de PDGF-BB más aptámero funcional ARC127 10 nM a 100 nM redujo la aparición de agrupaciones al nivel de referencia. La presencia de aptámero no tuvo efecto sobre la tasa de proliferación de las células determinada por el ensayo de MTT. Por tanto, el aptámero bloquea la adhesión de células a células de células U87 que son conocidas por tener bucles autocrinos accionados por PDGF. Parece que ARC 127 está bloqueando la unión del ligando expuesto en la superficie celular a otro receptor de células como se exponen por adhesión de células a células.

#### EJEMPLO 9: Ensayo de ELK luciferasa accionado por PDGF

**[0332]** Para demostrar adicionalmente la actividad del aptámero de PDGF ARC 127 se establecieron ensayos de genes indicadores mecanísticos de Elk luciferasa. Se sembraron 10.000 células 3T3/pocillo en DMEM/SBF al 10% en una placa de 96 pocillos. Se transfectaron usando FuGene (Roche, Indianápolis, IN) a una relación 3:1 con 5 ng de ELK-1 (Stratagene, La Jolla, CA) y 20 ng de plásmidos de pFR-luciferasa (Stratagene, La Jolla, CA). Cuando se añade PDGF a una concentración final de 50 ng/ml a células 3T3 puede observarse un aumento en la señal de luciferasa que se corresponde con el efecto del mitógeno sobre el gen indicador. El ensayo de luciferasa Steady Glo (Promega, Madison, WI) se usó para detectar luciferasa. Los resultados indican que una concentración de ARC 127 de tan sólo 3 nM reduce la señal de la luciferasa a niveles de no mitógeno. La  $CI_{50}$  de ARC127 deducida de este análisis es < 2 nM. (Figura 17)

#### EJEMPLO 10: Datos *in vivo* en xenoinjerto de cáncer de colon HT-29, LS174T y HCT-116

##### Modelos

**[0333]** Se establecieron estudios de eficacia *in vivo* para probar la hipótesis de que la inhibición de PDGF-BB y/o su receptor con ARC127 y ARC308 aumentan la eficacia de fármacos citotóxicos.

##### Estudios de HT-29 y LS174T

**[0334]** Visión general experimental. Se establecieron xenotrasplantes de cáncer de colon HT-29 o LS174T humanos en ratones sin pelo atímicos (ratones Nu/Nu, Charles River Labs, Wilmington, MA) inyectando ratones con  $1 \times 10^7$  células HT29 (ATCC, Manassas, VA) o  $2 \times 10^6$  células LS174T (ATCC Manassas, VA) subcutáneamente y dejando que los tumores crecieran durante 5 días. En el día 5 se tomaron dos medidas dimensionales de los tumores establecidos usando un compás calibrador digital. Una vez se habían tomado las medidas del tumor, los ratones se aleatorizaron en grupos de forma que el tamaño promedio del tumor fuera el mismo en cada grupo. Una vez se aleatorizaron, los ratones se trataron con irinotecan (Pfizer, NY, NY), que es un fármaco citotóxico que se muestra que tiene eficacia contra cáncer de colon en presencia o ausencia de bloqueo de PDGF usando un aptámero específico para PDGF u otro inhibidor de molécula pequeña, para determinar si el bloqueo de PDGF aumenta la eficacia del fármaco citotóxico.

Materiales y procedimientos. Se diseñó un experimento (Experimento 1) para probar una combinación de los agentes quimioterapéuticos conocidos GLEEVEC™ e irinotecan en un estudio de optimización de dosis en un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon HT29. La siguiente Tabla 7 resume el diseño experimental del Experimento 1 usando una línea celular de carcinoma de colon humano HT29 (ATCC, Manassas, VA), con un fármaco citotóxico, irinotecan (Pfizer, NY, NY) administrado a 150 mg/kg por inyección intraperitoneal una vez a la semana, además de un fármaco para bloquear la señalización de PDGF, GLEEVEC™ (Novartis, Basilea, Suiza), dosificado por vía oral a 50 mg/kg dos veces al día (lunes a viernes). Por el modo de acción de GLEEVEC™ se sabe que bloquea la función de receptores de PDGF, además de otros receptores para otros factores de crecimiento, el efecto no es necesariamente específico para PDGF. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 18A que muestran una representación del diámetro promedio del tumor medio por grupo en mm en función del tiempo para cada una de las pautas de tratamiento irinotecan 150 mg/kg a la semana, GLEEVEC™ 50 mg/kg por vía oral dos veces al día durante 5 días y terapias de combinación de irinotecan 150 mg/GLEEVEC™ 50 mg/kg dos veces al día durante 5 días. Estos datos muestran que GLEEVEC™ aumenta la eficacia de irinotecan solo en el modelo de xenotrasplante de cáncer de colon HT29. El bloqueo de PDGF mediado por GLEEVEC™ potenció la eficacia del tratamiento con irinotecan como se demuestra por la disminución de la tasa de crecimiento del tumor con respecto a animales tratados con irinotecan solo. Los resultados son estadísticamente significativos (prueba de la t de Student bilateral).

**Tabla 7:** Experimento 1: Estudio de optimización de dosis de irinotecan/GLEEVEC para HT29

| Inoculación del tumor |                |                    |                           |     |       | Administración del artículo de prueba |               |     |                | Administración de terapia de combinación<br>(DOSIS DESPUÉS DEL ARTÍCULO DE PRUEBA) |                |     |                            | Día de eutanasia |    |
|-----------------------|----------------|--------------------|---------------------------|-----|-------|---------------------------------------|---------------|-----|----------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----|----------------------------|------------------|----|
| Grupo                 | Nº de animales | Material de prueba | Dosis                     | Vía | Día   | Material de prueba                    | Dosis (mg/kg) | Vía | Día            | Material de prueba                                                                 | Dosis (mg/k g) | Vía | Día                        |                  |    |
| 1                     | 10             | HT-29              | 1x10 <sup>7</sup> células | SC  | Día 0 | Diluyente                             | DVE           | IP  | Días 7, 14, 21 | NA                                                                                 | NA             | IP  | Días 4 – 21 una vez al día | Por determinar   |    |
| 2                     | 10             |                    |                           |     |       | Diluyente                             | DVE           |     |                | ARC 127                                                                            | 50             |     |                            |                  |    |
| 3                     | 10             |                    |                           |     |       | Irinotecan                            | 150           |     |                | NA                                                                                 | NA             |     |                            |                  |    |
| 4                     | 10             |                    |                           |     |       | Irinotecan                            | 50            |     |                | NA                                                                                 | NA             |     |                            |                  |    |
| 5                     | 10             |                    |                           |     |       | Irinotecan                            | 150           |     |                | ARC 127                                                                            | 50             |     |                            |                  |    |
| 6                     | 10             |                    |                           |     |       | Irinotecan                            | 50            |     |                | ARC 127                                                                            | 50             |     |                            |                  |    |
| 7                     | 10             |                    |                           |     |       | Irinotecan                            | 150           |     |                | Gleevec                                                                            | 100            |     |                            |                  | PO |
| 8                     | 10             |                    |                           |     |       | Irinotecan                            | 50            |     |                | Gleevec                                                                            | 100            |     |                            |                  |    |
| 9                     |                |                    |                           |     |       | Diluyente                             | DVE           |     |                | Gleevec                                                                            | 100            |     |                            |                  |    |

1. Observaciones al lado de la jaula y clínicamente - diariamente  
2. Pesos corporales - cada dos semanas  
3. Mediciones del tumor - cada dos semanas empezando aproximadamente en el día 7  
4. Irinotecan total necesario - 450 mg (para 3 dosis)  
5. Gleevec total necesario - 1350 mg (para 36 dosis)  
6. Aptámero de PDGF total necesario - 675 mg (para 18 dosis)  
DVE = equivalente del volumen de dosis de tampón  
HT29 = carcinoma de colon humano; ATCC N° HTB-38  
IP =Intraperitoneal  
PO = por vía oral

**[0335]** Se diseñó otro experimento (Experimento 2) para probar ARC 127 e irinotecan en un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon usando la línea celular de carcinoma de colon humano LS174T (ATCC, Manassas, VA). El fármaco citotóxico, irinotecan (Pfizer, NY, NY), se dosificó una vez a la semana a 150 mg/kg por administración intraperitoneal. El ARC127 usado para bloquear la señalización de PDGF se dosificó a 50 mg/kg por administración intraperitoneal una vez al día, y GLEEVEC™ (Novartis, Basilea, Suiza) se dosificó por vía oral a 100 mg/kg una vez al día, lunes a viernes. ARC127 previene que PDGF-BB se una al receptor de PDGF; y tiene un PEG de 40 K unido. La siguiente Tabla 8 resume el diseño experimental para el Experimento 2. Los resultados del Experimento 2 se muestran en la Figura 18B y Figura 18C que demuestran que ARC 127 potenció la eficacia de tratamiento con irinotecan como se demuestra por la disminución de la tasa de crecimiento del tumor con respecto a animales tratados con irinotecan solo. Los resultados son estadísticamente significativos (prueba de la t de Student bilateral). Los datos muestran claramente que ARC127 aumenta la eficacia de irinotecan mejor que tanto el tratamiento de combinación de GLEEVEC™/irinotecan como irinotecan solo en el modelo de xenotrasplante de cáncer de colon LS174T. La pauta de dosificación de GLEEVEC™ (100 mg/kg una vez al día, lunes a viernes, P.O.) hizo que los animales estuvieran moribundos y a estos grupos se les puso fin pronto en el experimento (Fig. 18B).

15

**Tabla 8.** Experimento 2: Estudio de dosificación de ARC127/irinotecan en el diseño experimental del modelo de xenoinjerto de cáncer de colon LS174T:

| Inoculación del tumor |                |                    |                              |     |          | Administración del artículo de prueba |               |     |                   | Administración de terapia de combinación<br>(DOSIS DESPUÉS DEL ARTÍCULO DE PRUEBA) |                |     |                                 | Día de eutanasia  |    |
|-----------------------|----------------|--------------------|------------------------------|-----|----------|---------------------------------------|---------------|-----|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----|---------------------------------|-------------------|----|
| Grupo                 | Nº de animales | Material de prueba | Dosis                        | Vía | Día      | Material de prueba                    | Dosis (mg/kg) | Vía | Día               | Material de prueba                                                                 | Dosis (mg/k) g | Vía | Día                             |                   |    |
| 1                     | 10             | LS174T             | 2×10 <sup>6</sup><br>células | SC  | Día<br>0 | Diluyente                             | DVE IP        | IP  | Días 8,<br>15, 22 | NA                                                                                 | NA             | IP  | Días 4, 22<br>una vez al<br>día | Por<br>determinar |    |
| 2                     | 10             |                    |                              |     |          | Diluyente                             | DVE           |     |                   | ARC 127                                                                            | 50             |     |                                 |                   |    |
| 3                     | 10             |                    |                              |     |          | Irinotecan                            | 150           |     |                   | NA                                                                                 | NA             |     |                                 |                   |    |
| 4                     | 10             |                    |                              |     |          | Irinotecan                            | 150           |     |                   | ARC 127                                                                            | 50             |     |                                 |                   |    |
| 5                     | 10             |                    |                              |     |          | Irinotecan                            | 150           |     |                   | Gleevec                                                                            | 100            |     |                                 |                   | PO |
| 6                     | 10             |                    |                              |     |          | Diluyente                             | 150           |     |                   | Gleevec                                                                            | 100            |     |                                 |                   |    |

1. Observación al lado de la jaula y clínicamente - diariamente  
 2. Pesos corporales - cada dos semanas  
 3. Mediciones del tumor - cada dos semanas empezando aproximadamente en el día 4  
 4. Irinotecan total necesario - 337,5 mg (para 3 dosis)  
 5. Gleevec total necesario - 360 mg (para 18 dosis)  
 6. Aptámero de PDGF total necesario - 450 mg (para 10 dosis)  
 DVE = equivalente del volumen de dosis de tampón  
 LS174T = carcinoma de colon humano  
 IP = Intraperitoneal

**[0336]** Se diseñó un tercer experimento (Experimento 3) para probar pautas de dosificación de ARC308/irinotecan y GLEEVEC™/irinotecan en un modelo de xenotrasplante de cáncer de colon usando la línea celular de carcinoma de colon humano LS174T (ATCC). La Tabla 9 resume el diseño experimental para el Experimento 3. El fármaco citotóxico irinotecan (Pfizer, NY, NY) se dosificó por administración intraperitoneal a 150 mg/kg una vez a la semana. ARC308 se dosificó por administración intraperitoneal a 50 mg/kg una vez al día, y GLEEVEC™ se dosificó a 50 mg/kg una vez al día, lunes a viernes. ARC308 previene que PDGF-BB se una al receptor de PDGF; esta molécula tiene un PEG de 30 K unido. Los resultados del Experimento 3 se muestran en las Figuras 19A y 19B que muestran que ARC308 potenció la eficacia de tratamiento con irinotecan como se demuestra por la disminución de la tasa de crecimiento del tumor con respecto a animales tratados con irinotecan solo. A diferencia, la pauta de dosificación de GLEEVEC™ (50 mg/kg una vez al día, lunes a viernes, P.O) no potenció la eficacia de irinotecan. Los resultados son estadísticamente significativos (prueba de la t de Student bilateral).

**Tabla 9.** Experimento 3: Estudio de ARC308/irinotecan y GLEEVEC/irinotecan en el modelo de xenoinjerto de cáncer de colon LS174T.

| Inoculación del tumor |                |                    |                            |     |       | Administración del artículo de prueba |               |     |                | Administración de terapia de combinación<br>(DOSIS DESPUÉS DEL ARTÍCULO DE PRUEBA) |                |     |                            | Día de eutanasia |    |     |
|-----------------------|----------------|--------------------|----------------------------|-----|-------|---------------------------------------|---------------|-----|----------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----|----------------------------|------------------|----|-----|
| Grupo                 | Nº de animales | Material de prueba | Dosis                      | Vía | Día   | Material de prueba                    | Dosis (mg/kg) | Vía | Día            | Material de prueba                                                                 | Dosis (mg/k g) | Vía | Día                        |                  |    |     |
| 1                     | 10             | LS174T             | 2x 10 <sup>6</sup> células | SC  | Día 0 | Diluyente                             | DVE           | IP  | Días 8, 15, 22 | NA                                                                                 | NA             | IP  | Días 5 - 22 una vez al día | Por determinar   |    |     |
| 2                     | 10             |                    |                            |     |       | Diluyente                             | DVE           |     |                | ARC 308                                                                            | 50             |     |                            |                  |    |     |
| 3                     | 10             |                    |                            |     |       | Irinotecan                            | 150           |     |                | NA                                                                                 | NA             |     |                            |                  |    |     |
| 4                     | 10             |                    |                            |     |       | Irinotecan                            | 150           |     |                | ARC 308                                                                            | 50             |     |                            |                  |    |     |
| 5                     | 10             |                    |                            |     |       | Irinotecan                            | 150           |     |                | Gleevec                                                                            | 50             |     |                            |                  | PO | L-V |
| 6                     | 10             |                    |                            |     |       | Diluyente                             | DVE           |     |                | Gleevec                                                                            | 50             |     |                            |                  |    |     |

1. Observaciones al lado de la jaula y clínicamente - diariamente  
 2. Pesos corporales - cada dos semanas  
 3. Mediciones del tumor - cada dos semanas empezando aproximadamente en el día 4  
 4. Irinotecan total necesario - 337,5 mg (para 3 dosis)  
 5. Gleevec total necesario - 360 mg (para 18 dosis)  
 6. Aptámero de PDGF total necesario - 450 mg (para 18 dosis)  
 DVE = equivalente del volumen de dosis de tampón  
 LS174T = carcinoma de colon humano  
 IP = Intraperitoneal

**[0337]** Un análisis de eficacia de tres grupos de tratamiento en este estudio se muestra en la Tabla 10 en términos de log destrucción de células y log destrucción neta de células. Log destrucción de células es el logaritmo (base 10) del número de células tumorales antes del tratamiento dividido entre el número de células después del tratamiento. Log destrucción de células se calcula como  $(T-C)/(3,32 \times D)$  en la que T = el tiempo en días para que el grupo tratado alcance un cierto tamaño del tumor en volumen, C = el tiempo en días para que el grupo de control alcance el mismo tamaño del tumor en volumen y D = el tiempo para que el tumor tratado con control se doble en volumen. Un log destrucción de células inferior a 0,7 indica sin actividad, mientras que un valor superior a 2,8 indica alta actividad. El log destrucción neta de células tiene en cuenta la duración del tratamiento (R), que fue 18 días, usando la fórmula  $[(T-C)-R]/(3,32 \times D)$ . Un log destrucción neta de células inferior a 0 indica sin actividad del tratamiento en comparación con el control, mientras que un valor mayor o igual a 0 indica actividad. El tamaño diana fue 1000 mm<sup>3</sup>, el tiempo de duplicación fue 3,25 días y el grupo de control fue el grupo al que se administró el vehículo (0,9% de cloruro sódico en agua). ARC308 solo no mostró actividad. Aunque irinotecan mostró actividad, la adición de tratamiento concomitante con ARC308 (50 mg/kg) aumentó 1,62 y 5,29 veces la actividad determinada por log destrucción de células y log destrucción neta de células. Los valores de log destrucción de células y log destrucción neta de células para el tratamiento combinado con irinotecan y ARC308 (50 mg/kg) se obtuvieron extrapolando el tamaño del tumor para este grupo con respecto al tamaño diana usando una curva de crecimiento con la misma pendiente que la del grupo tratado con irinotecan solo, ya que el volumen promedio del grupo de tratamiento de combinación nunca alcanzó 1000 mm<sup>3</sup> en el periodo de tiempo del experimento.

20 **Tabla 10:** Análisis de la eficacia de ARC308

| Tratamiento                | Log destrucción de células | Log destrucción de células | Evaluación de la actividad |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>ARC308</b>              | 0                          | -1,67                      | Inactiva                   |
| <b>Irinotecan</b>          | 1,95                       | 0,28                       | Activa                     |
| <b>Irinotecan + ARC308</b> | 3,15                       | 1,48                       | Activa                     |

**[0338]** En resumen, estos estudios *in vivo* en los modelos de xenoinjerto de cáncer de colon HT-29 y LS174T confirman que el bloqueo de PDGF afectado por los aptámeros terapéuticos de la presente divulgación puede aumentar la eficacia del tratamiento con irinotecan.

**[0339]** Se diseñó un cuarto experimento (Experimento 4) para probar adicionalmente pautas de dosificación de ARC308/irinotecan en un modelo de xenotrasplante de cáncer de colon usando la línea celular de carcinoma de colon humano LS174T (ATCC). La Tabla 11 resume el diseño experimental para el Experimento 4.

**[0340]** Estos estudios mostraron de nuevo que ARC308 previene que PDGF-BB se una al receptor de PDGF y potenció la eficacia del tratamiento con irinotecan como se demuestra por la disminución de la tasa de crecimiento del tumor con respecto a animales tratados con irinotecan solo en un modo dependiente de la dosis. Como se muestra en la Figura 28, ARC308 mostró un potenciamiento dependiente de la dosis de la eficacia del tratamiento con irinotecan como se demuestra por la disminución de la tasa de crecimiento del tumor en el grupo tratado con irinotecan más ARC308 (25 mg/kg) con respecto a animales tratados con irinotecan más ARC308 (1 mg/kg). Esto fue particularmente evidente en el periodo de pos-dosificación (días 23-53) cuando a los ratones no se les administró ni irinotecan ni ARC308. La Figura 29 es una representación de Kaplan-Meier de los datos mostrados en la Figura 28 en la que se representa el porcentaje de ratones en un grupo de tratamiento que presentan tumores inferiores a 500 mm<sup>3</sup> [como se calcula a partir de mediciones con compás calibrador digital de la longitud y el ancho de los tumores usando la siguiente fórmula: volumen =  $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$ ]. De nuevo se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con irinotecan más ARC308 (25 mg/kg) con respecto a animales tratados con irinotecan más ARC308 (1 mg/kg), soportando un potenciamiento de la eficacia de irinotecan dependiente de la dosis de ARC 308. En el día 38, todos los ratones en el grupo de irinotecan más ARC308 (1 mg/kg) habían desarrollado tumores superiores o iguales a 500 mm<sup>3</sup>, mientras que el 56% de los ratones en el grupo tratado con irinotecan más ARC308 a 25 mg/kg todavía presentaba tumores inferiores a 500 mm<sup>3</sup>.

**Tabla 11:** Experimento 4: Estudio de ARC308/irinotecan en el modelo de xenoinjerto de cáncer de colon LS174T.

| Inoculación del tumor |                |                    |                             |     |       | Administración del artículo de prueba |               |     |                | Administración de terapia de combinación<br>(DOSIS DESPUÉS DEL ARTÍCULO DE PRUEBA) |               |     |                           | Día de eutanasia |
|-----------------------|----------------|--------------------|-----------------------------|-----|-------|---------------------------------------|---------------|-----|----------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----|---------------------------|------------------|
| Grupo                 | Nº de animales | Material de prueba | Dosis                       | Vía | Día   | Material de prueba                    | Dosis (mg/kg) | Vía | Día            | Material de prueba                                                                 | Dosis (mg/kg) | Vía | Día                       |                  |
| 1                     | 10             | LS174T             | 2 x 10 <sup>6</sup> células | SC  | Día 0 | Diluyente                             | DVE           | IP  | Días 8, 15, 22 | Diluyente                                                                          | DVE           | IP  | Días 5- 22 una vez al día | Por determinar   |
| 2                     | 10             |                    |                             |     |       | Diluyente                             | DVE           |     |                | ARC 308                                                                            | 50            |     |                           |                  |
| 3                     | 10             |                    |                             |     |       | Diluyente                             | DVE           |     |                | 50 de control vacío                                                                | 50            |     |                           |                  |
| 4                     | 10             |                    |                             |     |       | irinotecan                            | 150           |     |                | Diluyente                                                                          | DVE           |     |                           |                  |
| 5                     | 10             |                    |                             |     |       | irinotecan                            | 150           |     |                | ARC 308                                                                            | 50            |     |                           |                  |
| 6                     | 10             |                    |                             |     |       | irinotecan                            | 150           |     |                | ARC 308                                                                            | 25            |     |                           |                  |
| 7                     | 10             |                    |                             |     |       | irinotecan                            | 150           |     |                | ARC 308                                                                            | 10            |     |                           |                  |
| 8                     | 10             |                    |                             |     |       | irinotecan                            | 150           |     |                | ARC 308                                                                            | 1             |     |                           |                  |
| 9                     | 10             |                    |                             |     |       | irinotecan                            | 150           |     |                | ARC 308                                                                            | 50            |     |                           |                  |

1. Observaciones al lado de la jaula y clínicamente - diariamente  
 2. Pesos corporales - cada dos semanas  
 3. Mediciones del tumor - cada dos semanas empezando aproximadamente en el día 4  
 4. Irinotecan total necesario- 562,5 mg (para 3 dosis)  
 5. Aptámero de PDGF total necesario - 612 mg (para 18 dosis); 75 mg para 6 dosis: suma total= 687 mg  
 6. Aptámero de control negativo total necesario - 225 mg (para 18 dosis)  
 DVE = equivalente del volumen de dosis de tampón  
 LS174T= carcinoma de colon humano  
 IP = Intraperitoneal

**[0341]** Se realizó un quinto estudio de xenoinjerto para examinar el efecto de tratar tumores humanos en ratones atímicos con ARC593 en comparación con vehículo. En el día 0, células tumorales LS174T de una línea de células de cáncer colorrectal humano se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho de ratones sin pelo atímicos no consanguíneos hembra de 8-9 semanas edad de Harlan (Indianápolis, Indiana). Los tumores subcutáneos resultantes se midieron en el día 6 con compases calibradores para determinar su longitud y ancho y los ratones se pesaron; los tamaños del tumor se calcularon usando la fórmula  $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$  y se expresaron como milímetros cúbicos. Los ratones con tumores inferiores a  $7,2 \text{ mm}^3$  y superiores a  $26,95 \text{ mm}^3$  se excluyeron de la siguiente formación de grupos. Se formaron dos grupos de ratones, 12 ratones por grupo, por aleatorización de forma que los tamaños medios del tumor para cada grupo fueran esencialmente iguales (media de grupos  $\pm$  desviación estándar de grupos =  $17,16 \pm 0,16 \text{ mm}^3$ ), con desviaciones estándares de grupos similares (media de desviaciones estándares de grupos  $\pm$  desviación estándar de desviaciones estándares de grupos =  $6,20 \pm 1,0 \text{ mm}^3$ ).

**[0342]** Cada grupo se asignó a una pauta de tratamiento del siguiente modo. A todos los ratones se les administró una vez al día ARC593 o vehículo empezando en el día 6 con la última dosis administrada en el día 23. Las dosis se ajustaron para cambios del peso corporal dos veces por semana y a todos los ratones se les administró vehículo o aptámero a 10 ml de disolución de dosificación por kg de peso corporal administrado intraperitonealmente. El grupo 1 recibió solución salina normal como control de vehículo; el grupo 2 recibió ARC593, 50 mg/kg de ratón peso corporal.

**[0343]** Las disoluciones de dosificación de ARC593 se prepararon disolviendo aptámero liofilizado en solución salina normal, ajustando la concentración de la disolución de dosificación con solución salina normal hasta que se lograra la correcta concentración como se ha determinado por análisis espectrofotométrico, y esterilizando por filtración las disoluciones resultantes a través de un filtro de  $0,22 \mu\text{m}$  en viales de muestra estériles que luego se mantuvieron, se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$  y se descongelaron durante la noche para su uso al día siguiente a  $4^\circ\text{C}$ . Se dejó que el aptámero alcanzara la temperatura ambiente durante una hora antes de la dosificación. El material sin usar se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  para su uso al día siguiente.

**[0344]** Durante y después del periodo de dosificación, los ratones se pesaron y los tumores se midieron dos veces por semana. Todos los resultados en términos de volumen del tumor se muestran en la Figura 30. El grupo 1 mostró la tasa de crecimiento del tumor esperada, con un tiempo de duplicación de aproximadamente 5 días. Un ratón en el grupo 1 tratado con vehículo se encontró muerto en el día 12. La muerte fue debida a hemorragia intraperitoneal resultante de lesión mecánica durante la dosificación intraperitoneal el día previo. Ese ratón se excluyó de otros análisis de datos. Los volúmenes del tumor por grupo se analizaron por la prueba del orden de Wilcoxon para grupos independientes, considerándose que  $p < 0,05$  era significativo. En el día 20, el último día que todos los ratones todavía estaban vivos en los grupos tratados con aptámero, los volúmenes del tumor en el grupo 2 fueron significativamente mayores que aquellos en el grupo 1. Después del día 20 se sacrificaron tres ratones del grupo 2 ya que sus tumores excedieron los volúmenes máximos autorizados por la IACUC. El efecto del potenciamiento del volumen del tumor del tratamiento con ARC593 fue evidente en la mayoría de los ratones tratados con ARC593.

**[0345]** El cambio durante el estudio en los pesos corporales corregidos con la media de grupo se examinó como una indicación de la toxicidad de los tratamientos. El peso corporal corregido es el peso corporal de un ratón menos el peso aproximado del tumor subcutáneo. El peso aproximado del tumor se determina a partir de la fórmula "peso (g) = volumen ( $\text{mm}^3$ )", determinándose el volumen como antes. Los pesos corporales corregidos así determinados reflejan cambios en el peso corporal no tumoral y, por tanto, son mejores indicadores de la pérdida de peso derivada de la toxicidad. Todos los grupos mostraron alguna disminución en el peso corporal corregido como es de esperar con el crecimiento de este tumor de xenoinjerto. No hubo diferencia significativa entre los grupos tratados con vehículo o aptámero (grupo 1, 2). Por tanto, el tratamiento con aptámero no aumentó la toxicidad como se mide por el peso corporal.

**[0346]** Se realizó un sexto estudio de xenoinjerto para examinar el efecto de tratar tumores humanos en ratones atímicos con ARC594 en comparación con vehículo. En el día 0, células tumorales LS174T de una línea de células de cáncer colorrectal humano se implantaron subcutáneamente en el hombro izquierdo de ratones sin pelo atímicos no consanguíneos hembra de 8-9 semanas de edad de Harlan (Indianápolis, Indiana). Los tumores subcutáneos resultantes se midieron en el día 12 con compases calibradores para determinar su longitud y ancho y los ratones se pesaron; los tamaños del tumor se calcularon usando la fórmula  $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$  y se expresaron como milímetros cúbicos. Los ratones con tumores inferiores a  $49,69 \text{ mm}^3$  y superiores a  $233,44 \text{ mm}^3$  se excluyeron de la siguiente formación de grupos. Se formaron dos grupos de ratones, 12 ratones por grupo, por aleatorización de forma que los tamaños medios del tumor para cada grupo fueran esencialmente iguales (media de grupos  $\pm$  desviación estándar de grupos =  $136,83 \pm 1,2 \text{ mm}^3$ ), con desviaciones estándares de grupos similares (media de desviaciones estándares de grupos  $\pm$  desviación estándar de desviaciones estándares de grupos =  $62,38 \pm 5,03 \text{ mm}^3$ ).

**[0347]** Cada grupo se asignó a una pauta de tratamiento del siguiente modo. A todos los ratones se les administró una vez al día ARC594 o vehículo empezando en el día 12 con la última dosis administrada en el día 27. Las dosis se ajustaron para cambios del peso corporal dos veces por semana y a todos los ratones se les administró

vehículo o aptámero a 10 ml de disolución de dosificación por kg de peso corporal administrado intraperitonealmente. El grupo 1 recibió solución salina normal como control de vehículo; el grupo 2 recibió ARC594, 50 mg/kg de ratón peso corporal.

5 **[0348]** Las disoluciones de dosificación de ARC594 se prepararon disolviendo aptámero liofilizado en solución salina normal, ajustando la concentración de la disolución de dosificación con solución salina normal hasta que se lograra la correcta concentración como se ha determinado por análisis espectrofotométrico y esterilizando por filtración las disoluciones resultantes a través de un filtro de 0,22 µm en viales de muestra estériles que luego se mantuvieron, se congelaron a -20°C y se descongelaron durante la noche para su uso al día siguiente a 4°C. Se dejó  
10 que el aptámero alcanzara la temperatura ambiente durante una hora antes de la dosificación. El material sin usar se almacenó a 4°C para su uso al día siguiente.

**[0349]** Durante y después del periodo de dosificación los ratones se pesaron y los tumores se midieron dos veces por semana. El grupo 1 mostró la tasa de crecimiento del tumor esperada, con un tiempo de duplicación de  
15 aproximadamente 7 días. Los volúmenes del tumor por grupo se analizaron por la prueba del orden de Wilcoxon para grupos independientes, considerándose que  $p < 0,05$  era significativo. No hubo diferencia significativa entre el volumen medio de los tumores del grupo 1 y 2.

**[0350]** Tras el análisis adicional de los datos, se observó que 2 ratones (2-8 y 2-9) en el grupo 2 presentaban  
20 tumores con tasas de crecimiento muy rápidas y tuvieron que sacrificarse en el día 24 ya que sus tumores excedieron los volúmenes máximos autorizados por la IACUC. Sus tiempos de duplicación de tumores fueron 2,3 y 1,6 días (para el ratón 2-8 y 2-9, respectivamente), en comparación con el tiempo de duplicación medio del grupo 1 de 7 días y de todos los otros miembros del grupo 2 de 6 días. Los tumores de dos ratones del grupo 2 tratados con ARC594 crecieron mucho más rápidos que cualquiera de los otros miembros del grupo 2 o grupo 1.

25

#### Estudio de HCT-116

**[0351]** Se realizó un séptimo estudio de xenoinjerto (Experimento 7) para confirmar la eficacia de ARC308 y  
ARC594 en la inhibición de crecimiento del tumor humano en ratones atímicos. En el día 0, células tumorales HCT-  
30 116 de una línea de células de cáncer colorrectal humano se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho de ratones sin pelo atímicos no consanguíneos hembra de 8-9 semanas de edad de Harlan (Indianápolis, Indiana). Los tumores subcutáneos resultantes se midieron en el día 8 con compases calibradores para determinar su longitud y ancho y los ratones se pesaron; los tamaños del tumor se calcularon usando la fórmula  $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$  y se expresaron como milímetros cúbicos. Los ratones con tumores inferiores a 62,65 mm<sup>3</sup> y superiores a 126,0 mm<sup>3</sup> se  
35 excluyeron de la siguiente formación de grupos. Se formaron diez grupos de ratones, 12 ratones por grupo, por aleatorización de forma que los tamaños medios del tumor para cada grupo fueran esencialmente iguales (media de grupos  $\pm$  desviación estándar de grupos = 82,67  $\pm$  0,00 mm<sup>3</sup>), con desviaciones estándares de grupos similares (media de desviaciones estándares de grupos  $\pm$  desviación estándar de desviaciones estándares de grupos = 21,34  $\pm$  0,00 mm<sup>3</sup>). También se formó un grupo adicional de 10 ratones (media  $\pm$  desviación estándar = 81,45  $\pm$  24,87  
40 mm<sup>3</sup>) como grupo que no recibió tratamiento, pero se monitorizó para la altura corporal y el volumen del tumor (grupo 1).

**[0352]** Cada grupo se asignó a una pauta de tratamiento del siguiente modo. A todos los ratones se les  
administró una vez al día ARC308, ARC 594 o vehículo a 10 ml/kg empezando en el día 8 con la última dosis  
45 administrada en el día 25. Las dosis se ajustaron para cambios del peso corporal dos veces por semana y a todos los ratones se les administró vehículo o aptámero a 10 ml de disolución de dosificación por kg de peso corporal administrado intraperitonealmente. El grupo 2 recibió solución salina normal como control de vehículo; los grupos 4 y 5 recibieron ARC308, 50 mg/kg de ratón peso corporal; los grupos 6 y 7 recibieron ARC594, 50 mg/kg de ratón peso corporal; el grupo 8 recibió ARC594, 10 mg/kg de ratón peso corporal; y el grupo 9 recibió ARC594, 1 mg/kg de  
50 ratón peso corporal. A los grupos 3, 10 y 11 se les administró vehículo intraperitonealmente una vez al día de los días 8-25. A los grupos 3, 5, 7, 8, y 9 se les administró en el día 11, 18 y 25 irinotecan (100 mg/kg, intraperitonealmente). Al grupo 10 se le administró imatinib (un fármaco de molécula pequeña que inhibe PDGFR, además de otras tirosina cinasas) a 50 mg/kg por vía oral dos veces al día a intervalos de 12 horas, empezando en el día 8. Al grupo 11 se le administró en el día 11 y 25 irinotecan (100 mg/kg, intraperitonealmente) y dos veces al  
55 día imatinib a 50 mg/kg administrado por vía oral en los días 8-12 y 23-25.

**[0353]** Se prepararon disoluciones de dosificación de ARC308 y ARC594 disolviendo aptámero liofilizado en  
solución salina normal, ajustando la concentración de la disolución de dosificación con solución salina normal hasta  
que se lograra la correcta concentración como se ha determinado por análisis espectrofotométrico, y esterilizando  
60 por filtración las disoluciones resultantes a través de un filtro de 0,22 µm en viales de muestra estériles que luego se mantuvieron a 4°C para el transporte, se congelaron a -20°C tras la recepción por Piedmont y se descongelaron durante la noche para su uso al día siguiente a 4°C. Se dejó que el aptámero alcanzara la temperatura ambiente durante una hora antes de la dosificación. El material sin usar se almacenó a 4°C para su uso al día siguiente. La solución salina normal para el control de vehículo se esterilizó por filtración en viales de muestra y se guardó del  
65 mismo modo que las disoluciones de dosificación de aptámero. Las disoluciones de dosificación de aptámero y vehículo se codificaron de manera que la dosificación personal fuera de identidad ciega. Para cada dosificación se

preparó irinotecan (Camptosar, NDC 009-7529) nuevo disolviendo el compuesto en 5% de dextrosa en agua (pH 4,8). Para cada dosificación se preparó Gleevec (mesilato de imantinib, NDC 0078-0373-866) nuevo disolviendo en 5% de dextrosa en agua (pH 4,8).

5 **[0354]** Durante y después del periodo de dosificación los ratones se pesaron y los tumores se midieron dos veces por semana. El grupo 1 mostró la tasa de crecimiento del tumor esperada, con un tiempo de duplicación de aproximadamente 7 días. Los volúmenes del tumor por grupo se analizaron por la prueba del orden de Wilcoxon para grupos independientes, considerándose que  $p < 0,05$  era significativo. No hubo diferencia significativa en los volúmenes del tumor entre los grupos sin tratamiento (grupo 1) y cualquier vehículo (grupo 2), ARC308 (50 mg/kg, grupo 4) o ARC594 (50 mg/kg, grupo 6). En el día 17, los volúmenes del tumor de los grupos a los que se les administró irinotecan solo o con aptámero (grupos 3, 5, 7, 8, 9) fueron significativamente más pequeños que los del grupo tratado con vehículo, y siguió así durante el resto del estudio. Los volúmenes del tumor del grupo de irinotecan más ARC308 (50 mg/kg, grupo 5) fueron significativamente más pequeños que aquellos del grupo tratado sólo con irinotecan en el día 21 y los días 28-38, después de lo cual quedaron suficientemente pocos ratones en los grupos para permitir la comparación. Los volúmenes del tumor del grupo de irinotecan más ARC594 (50 mg/kg, grupo 7) fueron significativamente más pequeños que aquellos del grupo tratado sólo con irinotecan de los días 28-52, después de lo cual quedaron suficientemente pocos ratones en los grupos para permitir la comparación. Los volúmenes del tumor del grupo con irinotecan más ARC594 (10 mg/kg, grupo 8) fueron significativamente más pequeños que aquellos del grupo tratado solo con irinotecan de los días 17-42. Los volúmenes del tumor del grupo con irinotecan más ARC594 (1 mg/kg, grupo 9) no fueron significativamente más pequeños que aquellos del grupo tratado sólo con irinotecan durante este estudio. No hubo diferencia significativa de volúmenes del tumor entre los grupos tratados con irinotecan más ARC308 (50 mg/kg, grupo 5), irinotecan más ARC594 (50 mg/kg, grupo 7) o irinotecan más ARC594 (10 mg/kg, grupo 8). Hubo una diferencia significativa en los volúmenes del tumor entre irinotecan más ARC594 (1 mg/kg, grupo 9) y el grupo tratado con irinotecan más ARC594 (50 mg/kg, grupo 7) en los días 38-56. Por tanto, la adición de ARC 308 o ARC594 al tratamiento con irinotecan produjo un aumento en la eficacia del irinotecan como se mide por el volumen del tumor reducido en este estudio de xenoinjerto, y hubo una respuesta a dosis al tratamiento con ARC594.

30 **[0355]** No hubo diferencia significativa en los volúmenes del tumor entre el grupo tratado con vehículo (grupo 2) y con Gleevec (grupo 10). La adición de irinotecan al tratamiento con Gleevec produjo toxicidad inaceptable que hizo que 4 de 12 ratones murieran en el día 17. Como resultado, el tratamiento con ambos fármacos se detuvo para este grupo hasta el día 23. El grupo de irinotecan más Gleevec mostró en realidad significativamente menos eficacia como se mide por los volúmenes del tumor de los días 28-45.

35 **[0356]** El cambio durante el estudio en los pesos corporales corregidos con la media de grupo se examinó como una indicación de la toxicidad de los tratamientos. El peso corporal corregido es el peso corporal de un ratón menos el peso aproximado del tumor subcutáneo. El peso aproximado del tumor se determina a partir de la fórmula "peso (g) = volumen ( $\text{mm}^3$ )", determinándose el volumen como antes. Los pesos corporales corregidos así determinados reflejan cambios en el peso corporal no tumoral y, por tanto, son mejores indicadores de la pérdida de peso derivada de la toxicidad. Todos los grupos mostraron alguna disminución en el peso corporal corregido como es de esperar con el crecimiento de este tumor de xenoinjerto. No hubo diferencia significativa entre los grupos sin tratamiento, vehículo, tratados tanto con aptámero solo como con Gleevec solo (grupo 1, 2, 4, 5, 10). Hubo una diferencia significativa con la adición de irinotecan al protocolo de tratamiento observado durante algunos momentos de tiempo en el estudio, pero no hubo diferencia entre los grupos que recibieron aptámero e irinotecan frente a irinotecan solo, con la excepción del día 17, cuando hubo una disminución significativa en el peso corporal entre el grupo de irinotecan más ARC594 (50 mg/kg, grupo 7), que no fue evidente en ningún otro momento. Por tanto, la adición de aptámero al tratamiento con irinotecan no aumentó la toxicidad, como se mide por el peso corporal.

#### EJEMPLO 11: Aptámeros bifuncionales de PDGF/VEGF como agentes terapéuticos oncológicos

50 **[0357]** Las terapias de combinación tienen ventajas con respecto a las terapias con un solo agente en el tratamiento de tumores sólidos como se muestra en los modelos de xenoinjerto de cáncer de colon con los aptámeros de la presente divulgación (Ejemplo 10). Similarmente, los aptámeros que pueden unirse a más de una de las dianas que participan en cánceres de tumor sólido son eficaces en potenciar los efectos terapéuticos de agentes terapéuticos individuales. Aptámeros tales como estos pueden inhibir múltiples proteínas (u otras dianas) y, por tanto, proporcionar un único compuesto que actúa de un modo que es sustancialmente equivalente a una combinación de compuestos. Los aptámeros multi-funcionales pueden manipularse, por ejemplo, a partir de combinaciones de aptámeros conocidos. Se muestra que estos aptámeros multifuncionales pueden unirse a múltiples dianas, y pueden generarse tanto directamente como por síntesis química en fase sólida, o por transcripción de un molde de ADN correspondiente. Ejemplos de tales aptámeros multi-funcionales incluyen aptámeros que pueden unirse a VEGF y PDGF para indicaciones contra el cáncer.

65 **[0358]** Con el fin de diseñar aptámeros multifuncionales de aptámeros previamente identificados (o regiones de aptámeros) es importante unir conjuntamente los aptámeros individuales mediante regiones del aptámero individual que no se ponen en contacto con la diana. Esto puede llevarse a cabo normalmente identificando regiones de la estructura secundaria que toleran la sustitución de nucleótidos individuales en la mayoría o en todas las

posiciones. Si se requieren unidades estructurales, tales como un tallo, entonces éstas pueden preservarse en el diseño final. Adicionalmente, es importante que la integridad estructural de cada uno de los aptámeros individuales se preserve en la estructura plegada final. Esto puede lograrse más fácilmente prediciendo las estructuras secundarias de la secuencia original de los aptámeros usando un algoritmo tal como infold y luego asegurando que estas estructuras secundarias predichas se preserven, según el mismo algoritmo, cuando son parte de la estructura unida conjuntamente. El algoritmo de infold general para determinar múltiples estructuras secundarias óptimas y subóptimas se describe por el autor del programa Dr. Michael Zuker (Science 244, 48-52 (1989)). Una descripción de los parámetros de plegamiento usados en el algoritmo se presenta en Jaeger, Turner y Zuker, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989) 86, 7706-7710 (véase también M. Zuker y col., Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology, J. Barciszewski y B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (1999)). Otros programas que pueden usarse según los procedimientos de la presente divulgación para obtener estructuras secundarias de secuencias de ácidos nucleicos incluyen, sin limitación, RNAstructure (Mathews, D.H.; Sabina, J.; Zuker, M.; y Turner, D.H., "Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure" Journal of Molecular Biology, 288, 911-940(1999), y RnaViz (Nucleic Acids Re., Nov. 15; 25(22):4679-84 (1997).

**[0359]** Habiendo determinado los motivos estructurales secundarios y las unidades de los aptámeros componentes, éstos se combinan en un único oligonucleótido que se pliega de un modo que preserva las funcionalidades de cada uno de los aptámeros constituyentes. Como resultado, los aptámeros multifuncionales pueden unirse a múltiples dianas y pueden generarse tanto directamente por síntesis química en fase sólida como por la transcripción de un ADN molde correspondiente.

**[0360]** Aptámeros bifuncionales de VEGF y PDGF. Los procedimientos de la presente divulgación se aplicaron para generar un aptámero que tiene especificidad de unión a PDGF-BB y a VEGF. Este aptámero multi-funcional se generó uniendo dos aptámeros individualmente identificados usando SELEX - uno (ARC 245, SEC ID N° 7) que reconoció VEGF pero no PDGF (véase la Figura 20A) y uno (ARC126, 5'-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3'-dT-3') que reconoció PDGF pero no VEGF (véase Figura 20B). ARC245 (SEC ID N° 7) es un aptámero completamente metilado con 2'O (2'-OMe) con especificidad de unión por VEGF con una  $K_D$  de aproximadamente 2 nM. El ARC126 usado en el aptámero multivalente es completamente ADN con especificidad de unión por PDGF con una  $K_D$  de aproximadamente 100 pM.

**[0361]** Un esquema de la estructura y secuencia del aptámero multivalente que puede unirse a PDGF y VEGF resultante de esta combinación, la secuencia TK.131.012.A (SEC ID N° 9), se muestra en la Figura 21A. Un segundo aptámero multivalente que puede unirse a VEGF y PDGF, secuencia TK.131.012.B (SEC ID N° 10), también se formó combinando ARC245 (SEC ID N° 7) y ARC 126 (Figura 21 B). Como se muestra en la Figura 21B, en este aptámero multivalente VEGF-PDGF, el primer par de mA-mU del tallo de ARC245 se eliminó antes de unir ARC245 y todos los desoxi-ARC126. En cada caso, como se muestra en la Figura 21, uno de los ligadores de PEG a ARC126 se eliminó para la adición del aptámero específico para VEGF y el otro se sustituyó con un ligador de oligonucleótido que tenía la secuencia dGdAdAdA (SEC ID N°: 97).

**[0362]** Los datos de unión para los aptámeros constituyentes y los aptámeros multivalentes se recogieron por ensayos de transferencia puntual en los que el aptámero marcado con radio se incubaba con proteína diana y luego es obligado a pasar a través de un sándwich de nitrocelulosa sobre nailon y los resultados se muestran en la Figura 22. La radiomarca asociada a proteína es capturada sobre la membrana de nitrocelulosa mientras que el equilibrio de la radiomarca es capturado sobre la membrana de nailon. Los datos de la radiomarca se recogen en una placa de detección y cuantificación de la radiactividad. Estos datos se usan entonces para calcular los coeficientes de unión. Los aptámeros multivalentes TK.131.012.A (SEC ID N° 9) y TK.131.012.B (SEC ID N° 10) se prepararon sintéticamente.

**[0363]** Los aptámeros multivalentes con la secuencia TK.131.012.A (SEC ID N° 9) muestran una  $K_D$  de aproximadamente 10 nM para PDGF y aproximadamente 10 nM para VEGF. El aptámero multivalente con la secuencia TK.131.012.B (SEC ID N° 10) muestra una  $K_D$  de aproximadamente 10 nM para PDGF y aproximadamente 5 nM para VEGF.

#### 55 EJEMPLO 12: Aptámeros de PDGF y VEGF que contienen motivos inmunoestimulantes

**[0364]** Para probar la capacidad de aptámeros que comprenden motivo(s) CpG para estimular la respuesta inmunitaria innata, un motivo CpG murino se manipuló en un aptámero específico para PDGF-B. Entonces, estos aptámeros se usaron en ensayos basados en células de ratón *in vitro* para confirmar la funcionalidad de los motivos CpG (por ejemplo, estimulación de la liberación de IL-6 y TNF- $\alpha$ ). Estos aptámeros también se usaron en ensayos de actividad biológica basada en el mecanismo de aptámeros (señalización de PDGF-B por la ruta de MAPK como se mide por el efecto del aptámero CpG-PDGF-B sobre la activación de PDGF-B de la fosforilación ERK) para confirmar la funcionalidad del motivo CpG que comprende aptámero tras la unión del aptámero a su diana, en este caso PDGF-B.

**[0365]** Para generar los aptámeros desvelados en este documento con un motivo CpG incorporado o unido, la

secuencia de los oligonucleótidos inmunoestimulantes previamente identificados que comprenden motivos CpG ("ISS-ODN" o "ODN") o fragmentos de los mismos se manipularon en ARC124, un aptámero identificado por el procedimiento SELEX que se une a PDGF-AB y -BB con una  $K_d$  de aproximadamente 100 pm. La secuencia de ARC124 se muestra a continuación.

5

**ARC124**

5' CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG3'InvdT (SEC ID N°: 11)

10 **[0366]** Las diversas secuencias de ODN, tanto de longitud completa como fragmentos o derivados de las mismas, se muestran a continuación 5'→ 3' de izquierda a derecha (en las que \* indica un enlace fosforotioato y 3'InvdT indica una T invertida en el extremo 3'). Además de estas secuencias de ODN o fragmentos de las mismas que se manipulan en aptámeros de PDGF también se usaron para controles en el ensayo de la capacidad de estos aptámeros para estimular la respuesta inmunitaria.

15

ISS-ODN (SEC ID N°: 12)

T\*G\*A\* C\*T\*G\* T\*G\*A\* A\*C\*G\* T\*T\*C\* G\*A\*G\* A\*T\*G\* A

ISS-ODN2 (SEC ID N°: 13)

20

T\*G\*A\* A\*C\*G\* T\*T\*C\* G\*A\*G\* A\*T\*

ISS-ODN3 (SEC ID N°: 14)

A\* A\*C\*G\* T\*T\*C\* G\*A\*G\* A\*T\*

25

ISS-ODN4 (SEC ID N°: 15)

A\* A\*C\*G\* T\*T\*C\* G\*A\*G

ISS-ODN5 (SEC ID N°: 16)

G\*T\*G\* A\*A\*C\* G\*T\*T\* C\*C\*A\* G

30

ODN 2006 (SEC ID N°: 17)

T\*C\*G\* T\*C\*G\* T\*T\*T\* T\*G\*T\* C\*G\*T\* T\*T\*T\* G\*T\*C\* G\*T\*T

ODN 2006,2 (SEC ID N°: 18)

35

G\* T\*C\*G\* T\*T\*T\* T\*G\*T\* C\*G\*T\* T\*T\*T\* G\*T

ODN 2006,3 (SEC ID N°: 19)

G\* T\*C\*G\* T\*T\*T\* T\*G\*T\* C\*G\*T\* T

40 **[0367]** ISS-ODN se identificó por Martin-Orzco y col., Int. Immunol., 1999. 11(7): 1111-1118. ISS-ODN 2-5 son fragmentos de ISS-ODN. ODN 2006 se identificó por Hartmann y col., Eur. J. Immunol. 2003. 33:1633-1641. ODN 2006.2 y 2006.3 son fragmentos de ODN 2006.

45 **[0368]** Las secuencias de los aptámeros de PDGF que comprenden un motivo CpG se muestran a continuación 5'→ 3' de izquierda a derecha (en las que \* indica un enlace fosforotioato y 3'InvdT indica una T invertida en el extremo 3'). Un esquema de la secuencia y estructura secundaria de estos aptámeros se muestra en la Figura 23.

**CpGARC124short a.k.a. shortARC124 (SEQ ID NO:20)**

A\*A\*C\* G\*T\*T\* C\*G\*A\* G\* CA GGC TAC GGC ACG TAG AGC ATC ACC ATG  
ATC CT\*G\* C/3InvdT/

**LongCpGARC124 a.k.a. longARC124 (SEQ ID NO:21)**

G\*T\*G\* A\*A\*C\* G\*T\*T\* C\*G\*A\* G\* CA GGC TAC GGC ACG TAG AGC ATC  
ACC ATG ATC CT\*G\* C/3InvdT/

**FullCpGARC124 también denominada en lo sucesivo ARC124 (SEQ ID NO:22)**

T\*G\*A\* C\*T\*G\* T\*G\*A\* A\*C\*G\* T\*T\*C\* G\*A\*G\* A\*T\*G\* A\* CA GGC TAC  
GGC ACG TAG AGC ATC ACC ATG ATC CT\*G\* T\*T\*T\* T\*T\*T\* T/3InvdT/

**TransARC124.1 (SEC ID N°: 23)**

C\*A\*G\*GCTAC\*G\*T\*T\*C\*GTAGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

5

**TransARC124.2 (SEC ID N°: 24)**

C\*A\*G\*GCTAC\*G\*T\*T\*T\*C\*GTAGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

**TransARC124.3 (SEC ID N°: 25)**

C\*A\*G\*GCAAC\*G\*T\*T\*T\*C\*GTTGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

10

**TransARC124.4 (SEC ID N°: 26)**

C\*A\*G\*GCAAC\*G\*T\*T\*T\*C\*GTTGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

**TransARC124.5 (SEC ID N°: 27)**

C\*A\*G\*GCAAC\*G\*T\*T\*T\*T\*C\*GTTGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

15

**TransARC124.6 (SEC ID N°: 28)**

C\*A\*G\*GCTACGTTTCGTAGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

20

**TransARC124.7 (SEC ID N°: 29)**

C\*A\*GGCTACGTTTCGTAGAGCATCACCATGATCC\*T\*G\*/3InvdT/

**TransARC124.8 (SEC ID N°: 30)**

C\*A\*G\*GCGTCGTTTTCGACGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

25

**TransARC124.9 (SEC ID N°: 31)**

C\*A\*G\*GCGTCGTCGTCGACGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

30

**TransARC124.10 (SEC ID N°: 32)**

C\*A\*G\*GCTTCGTCGTCGAAGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

35

**TransARC124.11 (SEC ID N°: 33)**

C\*A\*G\*GCTACGTCGTCGTAGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

35

**[0369]** Como se indica anteriormente, ISS-ODN y ODN 2006 son oligonucleótidos fosforotioados que se informa que son inmunoestimulantes y sus secuencias se derivan de la bibliografía. Las versiones truncadas de estos oligonucleótidos se diseñaron acortándolos en sus dos extremos 5' y 3'. Las construcciones resultantes son ISS-ODN2 a 5 y ODN 2006.2 a 3. Cada una de las construcciones recientemente designadas se probó en el ensayo de liberación de IL-6 para evaluar el efecto sobre la capacidad inmunoestimulante. La construcción más corta que todavía retenía la capacidad para inducir la liberación de IL-6 se escogió para la secuencia unida tanto al extremo 5' como 3' de ARC 124. Las construcciones que se marcan como GpGARC124short a.k.a. shortARC124, LongCpGARC124 a.k.a. longARC124 y FullCpGARC124 a.k.a. fullARC124 se corresponden con construcciones en las que ISS-ODN4 está unido al extremo 5' de ARC 124. Estas construcciones llevan enlaces fosforotioados en sus extremos 5' y 3', además de T invertida en su extremo 3' para asegurar la estabilidad adecuada en el ensayo basado en células, pero la parte central del núcleo correspondiente a ARC 124 está libre de enlaces fosforotioato.

40

45

**[0370]** ARC124 en la posición 8-9 y 13-14 tiene dos islas de CpG que se producen naturalmente. Las construcciones con la nomenclatura de TransARC124.1 a TransARC124.11 se corresponden con las construcciones que hicieron uso de estas dos secuencias de CpG que se producen naturalmente para crear una secuencia inmunoestimulante que maximizaría la respuesta de CpG basándose en informes en la bibliografía de que motivos CpG que están incorporados en longitudes variables de T crean efecto inmunoestimulante máximo. Por tanto, los cambios que se realizaron en ARC 124 consistieron en sustituir la protuberancia GCA no esencial en la posición 10-12 con diversos residuos de T. El efecto de variar la protuberancia de T sobre el efecto inmunoestimulante, además de la adición de enlaces fosforilados sobre la estabilidad de la construcción, se evalúan con el ensayo de liberación de IL-6 y fosforilación de ERK como se describe en este documento.

**[0371]** Para controles negativos, ARC124 se manipuló para eliminar los motivos CpG. Estas secuencias de control se muestran a continuación.

**TransARC124.3control (aptámero de control negativo de CpG)** (SEC ID N°: 34)  
C\*A\*G\*GCAAG\*C\*T\*T\*T\*G\*CTTGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

**TransARC124.5control (aptámero de control negativo de CpG)** (SEC ID N°: 35)  
C\*A\*G\*GCAAG\*C\*T\*T\*T\*G\*CTTGAGCATCACCATGATC\*C\*T\*G\*/3InvdT/

**[0372]** La actividad de aptámeros de PDGF que contienen islas de CpG de la presente divulgación se probó en ensayos basados en células. Sobrenadantes de células J774A.1 (células TIB), una línea celular de macrófagos de ratón (ATCC N° TIB-67), en presencia de motivos CpG contendrán más IL-6 y TNF-alfa que células no en la presencia de islas de CpG. Por tanto, se usó un ELISA en fase sólida de IL-6 y TNF-alfa para cuantificar los niveles de IL-6 y TNF-alfa liberados en los sobrenadantes (ambos de R and D Systems, Minneapolis, MN) tras la exposición a diversos oligonucleótidos que comprenden secuencias de CpG. Para el ELISA de IL-6, un anticuerpo monoclonal específico para IL-6 de ratón se recubrió previamente sobre una microplaca de 96 pocillos. Se usó un anticuerpo policlonal ligado a enzima específico para IL-6 de ratón para detectar cualquier IL-6 unida de los sobrenadantes de células. Para el ELISA de TNF-alfa, un anticuerpo policlonal purificado por afinidad específico para TNF-alfa de ratón se recubrió previamente sobre una microplaca de 96 pocillos. Un anticuerpo policlonal ligado a enzima específico para TNF-alfa de ratón se usó para detectar cualquier TNF-alfa unido de los sobrenadantes de células. Ambos ELISA usaron una lectura colorimétrica cuantificada por espectrofotometría.

**[0373]** Se cultivaron células J774A.1 (células TIB) en medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) con suero bovino fetal al 10% (SBF) (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Se sembraron 100.000 células en un número de pocillos apropiados en una placa de 24 pocillos un día antes del experimento. Los aptámeros de PDGF incorporados en CpG se incubaron con las células durante 24 y 48 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Las concentraciones de aptámero final fueron 1 µM y 10 µM. Los sobrenadantes se recogieron en los momentos de tiempo indicados y se centrifugaron durante 8 minutos a 5.000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes centrifugados se congelaron a -20°C hasta uso en el ELISA de IL-6 o TNF-alfa. Ambos ELISA se usaron según las recomendaciones del fabricante. Los oligonucleótidos que contenían el motivo CpG previamente informados por ser inmunoestimulantes, (ISS ODN y ODN2006) y LPS (Sigma), se usaron como controles positivos y aptámeros que no contenían CpG se usaron como controles negativos. La Figura 24A muestra los resultados de un ELISA de IL-6 que mide la liberación de IL-6 en células TIB usando sólo los ODN patrón como controles positivos, y los aptámeros que no contienen islas de CpG como controles negativos en el ensayo. Los controles positivos y negativos sólo se usaron en este experimento para establecer si este ensayo era suficientemente consistente para medir la liberación de IL-6 inducida por CpG. Los datos mostrados en la Figura 24B demuestran que los ISS ODN y versiones acortadas de los ISS ODN inducen la liberación de IL-6 en células TIB mejor que ODN2006 y versiones acortadas de los mismos. La Figura 24C muestra que las versiones cortas, largas y completas de ARC 124 incorporado con motivos CpG inducen la liberación de IL-6 en células TIB, además del ISS ODN. Los datos mostrados en la Figura 24D muestran que TransARC124.1-TransARC124.7 (SEC ID N°: 23 - SEC ID N°: 29) induce la liberación de IL-6 en células TIB. Los datos mostrados en la Figura 24E muestran que TransARC124.1-TransARC124.7 induce la liberación de TNF-alfa en células TIB.

**[0374]** Los resultados de los ensayos de liberación de IL-6 y liberación de TNF-alfa muestran que cuando los motivos CpG se incorporan en aptámeros existentes, en este caso ARC124 (SEC ID N°: 11), el aptámero puede provocar una respuesta de CpG.

#### EJEMPLO 13: Aptámeros de PDGF que contienen islas de CpG en el ensayo de fosforilación de ERK

**[0375]** La fosforilación de ERK se usó para probar si ARC124 (SEC ID N°: 11) retenía su funcionalidad después de la incorporación de motivos CpG en la secuencia del aptámero. Ciento cincuenta mil células 3T3 (una línea de células de fibroblastos de ratón que contiene PDGF-R) se sembraron en un número de pocillos apropiado en una placa de 12 pocillos un día antes del experimento y se privaron de suero en SBF al 0,5% durante la noche. Las células se trataron con 10 ng/ml de PDGF-BB (R & D Systems, Minneapolis, MN) en presencia o ausencia de aptámeros de PDGF que contienen islas de CpG durante 30 minutos. Las células se recogieron y se lisaron con tampón de lisis que contenía Tris 10 mM a pH 7,5, NaCl 100 mM, 0,125% de NP-40, 0,875% de Brij 97, vanadato de sodio 1,5 mM y 1 mini-comprimido de inhibidor de proteasa libre de EDTA. La concentración de proteína en los

lisados celulares se determinó usando reactivo de ensayo de proteínas BIO-RAD según las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad, Hercules, CA). Los lisados se prepararon añadiendo tampón de muestra LDS de NuPage 4X con DTT 0,1 M a una concentración final de 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se incubaron a 70°C durante 7 minutos. Se cargaron cuarenta microgramos de proteína total en cada pocillo de un gel de bis-Tris al 10% de NuPage 5 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El gel se ejecutó a 100 mA durante 1 hora. Entonces, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa HyBond ECL (Amersham, Piscataway, NJ) a 250 mA durante 3 horas. Después de la transferencia, la nitrocelulosa se bloqueó con 5% de BSA (Sigma, St. Louis, MO) en PBS durante una hora a temperatura ambiente. La membrana de nitrocelulosa se incubó con un anticuerpo de MAP cinasa p44/42 durante la noche a 4°C (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). La membrana de nitrocelulosa se lavó 3X con PBS que contenía 1% de Tween 20 y luego se incubó con un anticuerpo dirigido contra IgG de conejo conjugado con HRP durante 1 hora (Amersham, Piscataway, NJ). Después de una hora de incubación, la membrana de nitrocelulosa se lavó 3X con PBS que contenía Tween-20. La membrana se reveló usando un sistema de detección de ECL + transferencia Western según las recomendaciones del fabricante (Amersham, Piscataway, NJ) y se barrió usando STORM 860 (Amersham). Las células 3T3 en presencia de PDGF-BB sin aptámero se usaron como control positivo.

15 **[0376]** Los resultados muestran que shortARC124 y longARC124, ambos aptámeros de PDGF que llevan motivos CpG conocidos, todavía son funcionalmente activos y pueden bloquear la fosforilación de ERK tras la unión a PDGF.

20 **[0377]** En conjunto, los datos muestran que cuando los motivos CpG se incorporan en aptámeros existentes, el aptámero puede provocar una respuesta de CpG y todavía mantener la capacidad para bloquear los efectos accionados por diana no CpG (por ejemplo, PDGF) (por ejemplo, fosforilación de ERK-MAPK) con la misma potencia que los aptámeros nativos.

25 **EJEMPLO 14: Selección de PDGF-AA**

#### RESUMEN DE LA SELECCIÓN DE PDGF-AA

**[0378]** Se completó una selección de la forma corta de PDGF-AA (Roche Biomedical) usando un conjunto que contenía 2-fluoro-pirimidina. La ronda 1 de la selección empezó con incubación de  $2 \times 10^{14}$  moléculas del conjunto de ARC 212 modificado con 2'-F-pirimidina (5' GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGA-N40-GCUCGCGCAGAGACCAACCGAGAA 3') (SEC ID N°: 74), que incluía una adición de conjunto marcado con  $\alpha^{32}$ P-ATP, con 50 pmoles de proteína de PDGF-AA en un volumen final de 100  $\mu$ l durante 1 h a temperatura ambiente. La selección se realizó en 1X tampón SHMCK, pH 7,4 (Hepes 20 mM a pH 7,4, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM). Los complejos de ARN:PDGF-AA y las moléculas libres de ARN se separaron usando columnas de centrifugación de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m de Schleicher and Schuell (Keene, NH). La columna se lavó previamente con 1 ml de 1X SHMCK, y luego la disolución que contenía ARN:proteína se añadió a la columna y se centrifugó en una centrífuga a 1500 g durante 2 min. Los lavados con tampón se realizaron para eliminar aglutinantes no específicos de los filtros (ronda 1, 2 x 500  $\mu$ l de 1X SHMCK; en rondas posteriores se usaron lavados más rigurosos (aumento del número de lavados y volumen) para enriquecer aglutinantes específicos, los complejos de ARN:proteína unidos a los filtros se eluyeron luego con 2 x 200  $\mu$ l de lavados (2 x 100  $\mu$ l de lavados en rondas posteriores) de tampón de elución (urea 7 M, acetato sódico 100 mM, EDTA 3 mM, precalentado a 95°C). El ARN eluido se extrajo con fenol:cloroformo, luego se precipitó (40  $\mu$ g de glicógeno, 1 volumen de isopropanol). El ARN se transcribió de forma inversa con el sistema ThermoScript RT-PCR™ según sus instrucciones usando los cebadores 45 KMT.108.38.C (5' TAATACGACTCACTATAGGGAAAAGCGAATCATACACAAGA 3') (SEC ID N°: 75) y KMT.108.38.D (5' TTCTCGGTTGGTCTCTGGCGGAGC 3') (SEC ID N°: 76), seguido de amplificación por PCR (Tris 20 mM a pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KMT.108.38.C 0,5  $\mu$ M, KMT.108.38.D 0,5  $\mu$ M, 0,5 mM de cada dNTP, 0,05 unidades/ $\mu$ l de Taq polimerasa (New England Biolabs)). El molde de PCR se purificó usando el kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen). Los moldes se transcribieron usando marcado del cuerpo de ATP con  $\alpha^{32}$ P durante la noche a 37°C (4% de PEG-8000, Tris 40 mM a pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 12 mM, espermidina 1 mM, 0,002% de Triton x-100, 2'-OH-purinas 3 mM, 2'-F-pirimidinas 3 mM, DTT 25 mM, pirofosfatasa inorgánica, ARN polimerasa mutante individual T7 Y639F, 5 uCi de  $\alpha^{32}$ P-ATP). Las reacciones se desalaron usando columnas Bio Spin (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante.

55 **[0379]** Las rondas posteriores se repitieron usando el mismo procedimiento que para la ronda 1, pero con la adición de una etapa de selección negativa. Antes de la incubación con proteína diana, el ARN del conjunto se pasó a través de nitrocelulosa de 0,45 micrómetros para eliminar las secuencias de unión al filtro, entonces el filtrado continuó en la etapa de selección positiva. En rondas alternas, el ARN del conjunto se purificó en gel. Las reacciones de transcripción se inactivaron con EDTA 50 mM y se precipitaron con etanol, luego se purificaron sobre 60 1,5 mm de geles de poliacrilamida desnaturalizantes (urea 8 M, 10% de acrilamida; 19:1 de acrilamida:bisacrilamida). El ARN del conjunto se eliminó del gel por electroelución en un aparato Elutrap® (Schleicher and Schuell, Keene, NH) a 225 V durante 1 hora en 1X TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 0,2 mM). El material eluido se precipitó mediante la adición de acetato sódico 300 mM y 2,5 volúmenes de etanol.

65 **[0380]** El ARN permaneció en exceso de la proteína a través de la selección (ARN ~1  $\mu$ M). La concentración de proteína fue 500 nM para las 4 primeras rondas, y luego se goteó gradualmente sobre las rondas sucesivas. El

ARNt competidor se añadió a las reacciones de unión a 0,1 mg/ml empezando en la ronda 2. Se completaron un total de 11 rondas, realizándose ensayos de unión en las rondas de selección. La Tabla 12 contiene los detalles de la selección que incluyen la concentración de ARN del conjunto, la concentración de proteína y la concentración de ARNt usada para cada ronda. Los valores de elución (relación de valores de CPM de ARN unido a proteína frente a ARN total que fluía por la columna de filtración) junto con ensayos de unión se usaron para monitorizar el progreso de la selección.

**Tabla 12.** Condiciones usadas para la selección de PDGF-AA (forma corta humana)

| sfh-PDGFAA |                                |                  |                        |                       |         |              |                     |
|------------|--------------------------------|------------------|------------------------|-----------------------|---------|--------------|---------------------|
| Ronda nº   | Conc. del conjunto de ARN (uM) | Tipo de proteína | Conc. de proteína (uM) | Conc. de ARNt (mg/ml) | neg     | % de elución | Nº de ciclos de PCR |
| 1          | 3,3                            | sfhPDGFAA        | 0,5                    | 0                     | ninguna | 0,92         | 8                   |
| 2          | -1                             | sfhPDGFAA        | 0,5                    | 0,1                   | NC      | 0,24         | 15                  |
| 3          | -1                             | sfhPDGFAA        | 0,5                    | 0,1                   | NC      | 0,46         | 12                  |
| 4          | -1                             | sfhPDGFAA        | 0,5                    | 0,1                   | NC      | 0,1          | 15                  |
| 5          | 1                              | sfhPDGFAA        | 0,4                    | 0,1                   | NC      | 1,39         | 10                  |
| 6          | -1                             | sfhPDGFAA        | 0,4                    | 0,1                   | NC      | 0,5          | 8                   |
| 7          | 1                              | sfhPDGFAA        | 0,3                    | 0,1                   | NC      | 1,23         | 8                   |
| 8          | -1                             | sfhPDGFAA        | 0,3                    | 0,1                   | NC      | 0,44         | 10                  |
| 9          | 1                              | sfhPDGFAA        | 0,3                    | 0,1                   | NC      | 5,05         | 8                   |
| 10         | -1                             | sfhPDGFAA        | 0,2                    | 0,1                   | NC      | 0,83         | 10                  |
| 11         | 1                              | sfhPDGFAA        | 0,2                    | 0,1                   | NC      | 4,32         | 7                   |

10

Análisis de unión a proteína

**[0381]** Los ensayos de unión por transferencia puntual se realizaron durante toda la selección para monitorizar la afinidad de unión a proteína del conjunto. El ARN traza marcado con <sup>32</sup>P se combinó con PDGF-AA y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en 1X SHMCK más 0,1 mg/ml de ARNt para un volumen final de 20 µl. La reacción se añadió a un aparato de transferencia puntual (transferencia puntual de 1 minicolector de Schleicher and Schuell, acrílico), se ensambló (de arriba a abajo) con membranas de nitrocelulosa, nailon y de transferencia en gel. El ARN que está unido a proteína se captura sobre el filtro de nitrocelulosa, mientras que el ARN no unido a proteína se captura sobre el filtro de nailon. Cuando se observó una relación positiva significativa de unión de ARN en presencia de PDGF-AA frente a en ausencia de PDGF-AA, el conjunto se clonó usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. El molde del conjunto de la ronda 10 se clonó y se obtuvieron 17 secuencias. Sólo se observaron cinco secuencias diferentes, con dos familias principales y una única secuencia (no de las dos familias). Para la determinación de K<sub>d</sub>, los transcritos de ARN del clon se marcaron en el extremo 5' con γ-<sup>32</sup>P-ATP. Los valores de K<sub>d</sub> se determinaron usando el ensayo de transferencia puntual y ajustando una ecuación que describía un complejo 1:1 de ARN:proteína a los datos resultantes (Kaleidagraph, Figuras 25A y 25B). Los resultados de la caracterización de unión a proteína se tabularon en la Tabla 13. Los clones con alta afinidad por PDGF-AA se estudiaron y se cribaron para funcionalidad en los ensayos basados en células.

30

**Tabla 13.** Actividad de unión a clon\*

**R10**

**Clones de PDGF-AA**

| Nº | Nombre del clon | PDGF-AA (forma corta humana) K <sub>d</sub> (nM) | PDGF-AA (rata) K <sub>d</sub> (nM) |
|----|-----------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|
| 1  | ARX33P1.D1      | N.U.                                             | N.U.                               |
| 2  | ARX33P1.D2      | 104,5                                            | 51,7                               |
| 3  | ARX33P1.E5      | 117,0                                            | 57,4                               |
| 4  | ARX33P1.E10     | 132,9                                            | 47,1                               |
| 5  | ARX33P1.E11     | N.B.                                             | N.B.                               |

**N.U.** = no se observa unión significativa

\*Todas las mediciones se hicieron en presencia de 0,1 ARNt a lo largo del conjunto sin tratamiento previo ARC 212 (que no mostró unión significativa). Cuando el ARNt no se incluyó en las reacciones, los valores de K<sub>d</sub> medidos fueron aproximadamente 2-3-veces inferiores (es decir, mayor afinidad).

Aptámeros de PDGF-AA

**[0382]** Las secuencias para los aptámeros de forma corta PDGF-AA de la divulgación se presentan en la Tabla 14. En los aptámeros de la divulgación derivados bajo las condiciones de esta selección, las pirimidinas (C y U) están fluoradas en la posición 2'.

35

**Tabla 14:** Información de secuencias para aptámeros (de forma corta) PDGF-AA

**ARX33P1.D1** (SEQ ID NO: 77)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCGCCAGGAGCAAAGUCACGGAGGAGU  
GGGGUACGAAUGCUCGCCAGAGACCAACCGAGAA

**ARX33P1.D2** (SEQ ID NO: 78)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACCGGGAACUCGGAUUCUUCGCAUGUGG  
AUGCGAUCAGUAUGCUCGCCAGAGACCAACCGAGAA

**ARX33P1.E5** (SEQ ID NO: 79)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACCGGGAACUCGGAUUCUUCACAUGUGG  
AUGUGAUCAGUAUGCUCGCCAGAGACCAACCGAGAA

**ARX33P1.E10** (SEQ ID NO: 80)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACCGGGAACUCGGAUUCUUCGCAUGUGG  
AUGCGAUCAGUAUGCUCGCCAGAGACCAACCGAGAA

**ARX33P1.E11** (SEQ ID NO: 81)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAGUGGAGGAGGUAUGUAUGGUUUGU  
GCGUCUGGUGCGGUGCUCGCCAGAGACCAACCGAGAA

Ensayos basados en células con aptámeros de PDGF-AA

**[0383]** Los aptámeros de PDGF-AA que mostraron unión *in vitro* se probaron en el ensayo de proliferación de 3T3 para su capacidad para inhibir la proliferación de células 3T3 inducida por PDGF-AA. El ensayo se estableció como se ha descrito previamente usando una valoración de aptámero de PDGF-AA (0-1 uM) contra una concentración constante (50 ng/ml) de proteína de PDGF-AA (R & D Systems). Los resultados en la Figura 26 muestran que los aptámeros de PDGF-AA ARX33P1.D2, ARX33P1.E5 y ARX33P1.E10 inhiben la proliferación de células 3T3 inducida por PDGF-AA, pero no son muy potentes. La Figura 27 muestra que los aptámeros de PDGF-AA no tienen efecto sobre la proliferación de células 3T3 inducida por PDGF-BB, que indica que los aptámeros de PDGF-AA son altamente específicos para la isoforma PDGF-AA.

EJEMPLO 15: Estudio de dosis diaria de ARC308 y ARC594 en modelo de carcinoma pulmonar de Lewis de ratón

**[0384]** Un trozo de 1 mm<sup>3</sup> de carcinoma pulmonar de Lewis se implantó bajo la piel dorsal de ratones C57BL/6 naturales y se dejó que creciera. Empezando en el día cinco después de la implantación, cinco ratones se trataron durante siete días, intraperitonealmente, del siguiente modo: cinco ratones se trataron con vehículo (solución salina) una vez al día, cinco ratones se trataron con el aptámero ARC308 a 50 mg/kg, una vez al día, y cinco ratones se trataron con el aptámero ARC594 a 50 mg/kg, una vez al día. ARC308 también se denomina en este documento AX101 y ARC594 también se denomina en este documento AX102. Al final del periodo de siete días, los ratones se anestesiaron, y los siguientes tejidos se fijaron por perfusión vascular con 1% de paraformaldehído, se extrajeron y se congelaron para seccionar en el crióstato: tejido de tumor (carcinoma pulmonar de Lewis), páncreas, hígado, riñón, tráquea, bazo, yeyuno y tiroides. Las rebanadas resultantes se tiñeron con anticuerpos contra diversos marcadores como se describe a continuación.

Tinción con anticuerpos anti-CD31 y anti-α-SMA

**[0385]** Las secciones de tumores se cortaron (80 μm) y se tiñeron con tanto anticuerpos anti-CD31 como anti-α-actina de músculo liso (α-SMA). Se obtuvieron imágenes de microscopía de fluorescencia digital para las mediciones de la densidad de área usando una cámara de CCD de RGB de 3 chips con baja luz CoolCam. Los resultados de este experimento se representan en la Figura 31. Además, se obtuvieron imágenes de los tumores por microscopía confocal.

**[0386]** Se determinó un valor umbral de fluorescencia de 45 a 50 (intensidad de fluorescencia = 0 <255) que representaba con la mayor exactitud la densidad de área de la tinción con CD31 y α-SMA en imágenes microscópicas de fluorescencia de carcinoma pulmonar de Lewis (espesor de la sección 80 μm). Los valores medios para la densidad de área (% de la media del área superficial del tumor ± E.E; n= 3-5 ratones por grupo) para vasos sanguíneos teñidos con CD31 y pericitos inmunorreactivos de α-SMA se resumen en la siguiente Tabla 15.

**Tabla 15:** Densidades de área

| Tratamiento | Media de CD31 | E.E. de CD31 | α-SMA | E.E. de α-SMA | Recuento |
|-------------|---------------|--------------|-------|---------------|----------|
| Vehículo    | 16,21         | 1,47         | 11,48 | 0,73          | 3        |
| ARC308      | 8,42          | 0,92         | 2,87  | 0,71          | 5        |
| ARC594      | 6,05          | 0,68         | 2,03  | 0,32          | 4        |

**[0387]** Los resultados son estadísticamente significativos como se evaluó usando ANOVA (análisis de varianza entre grupos) seguido de la prueba de Fisher y Bonferroni para comparaciones múltiples, véase, Nouchedeji JM, White RJ, Dunn CD. Comput. Programs Biomed. 1982 14(2):197-205, como se muestra en las siguientes Tablas 16 y 17.

Tabla 16:

| PLSD de Fisher para la densidad de área |             |                    |                      |         |   |
|-----------------------------------------|-------------|--------------------|----------------------|---------|---|
| Efecto: grupo                           |             |                    |                      |         |   |
| Nivel de significancia: 5%              |             |                    |                      |         |   |
|                                         |             | Diferencias medias | Diferencias críticas | Valor p |   |
| ARC308-CD31                             | veh-CD31    | -7,797             | 2,557                | <0,0001 | S |
| ARC594-CD31                             | veh-CD31    | -10,165            | 2,696                | <0,0001 | S |
| ARC308-CD31                             | ARC594-CD31 | 2,368              | 2,557                | 0,0676  |   |
| ARC308-SMA                              | veh-SMA     | -8,612             | 2,784                | <0,0001 | S |
| ARC594-SMA                              | veh-SMA     | -9,459             | 2,912                | <0,0001 | S |
| ARC308-SMA                              | ARC594-SMA  | 0,846              | 2,557                | 0,4969  |   |

Tabla 17\*:

| Bonferroni/Dunn para la densidad de área |             |                    |                      |           |   |
|------------------------------------------|-------------|--------------------|----------------------|-----------|---|
| Efecto: grupo                            |             |                    |                      |           |   |
| Nivel de significancia: 5%               |             |                    |                      |           |   |
|                                          |             | Diferencias medias | Diferencias críticas | Valor pes |   |
| ARC308-CD31                              | veh-CD31    | -7,797             | 4,098                | <0,0001   | S |
| ARC594-C.D31                             | veh-CD31    | -10,165            | 4,32                 | <0,0001   | S |
| ARC308-CD31                              | ARC594-CD31 | 2,368              | 4,098                | 0,0676    |   |
| ARC308-SMA                               | veh-SMA     | -8,612             | 4,462                | <0,0001   | S |
| ARC594-SMA                               | veh-SMA     | -9,459             | 4,666                | <0,0001   | S |
| ARC308-SMA                               | ARC594-SMA  | 0,846              | 4,098                | 0,4969    |   |

\*Las comparaciones en esta tabla no son significativas a menos que el valor p correspondiente sea inferior a 0,0033.

5 **[0388]** Estos resultados demuestran que ambos aptámeros redujeron significativamente la densidad de área de vasos sanguíneos teñidos con CD31 y pericitos positivos para  $\alpha$ -SMA en carcinoma pulmonar de Lewis. ARC308 redujo el 50% la densidad de vasos sanguíneos tumorales, mientras que ARC594 la redujo el 60%. El área de densidad de pericitos inmunorreactivo de  $\alpha$ -SMA se redujo aproximadamente el 75% con cualquier aptámero. Además, la obtención de imágenes confocales reveló que el carcinoma pulmonar de Lewis que no había sido tratado con aptámero tenía abundantes vasos con pericitos anormalmente sueltos, mientras que el tratamiento con cualquier aptámero produjo la supervivencia de vasos que tanto no tenían pericitos como tenían pericitos que tenían asociación estrecha normal sobre vasos tumorales.

15 Tinción con anticuerpos anti-CD31 y anti-colágeno tipo IV

15 **[0389]** Las secciones de tumores se cortaron (80  $\mu$ m) y se tiñeron con tanto anticuerpo anti-CD31 como anti-colágeno tipo IV. Las imágenes de microscopio de fluorescencia digital se obtuvieron para las mediciones de densidad de área usando una cámara CoolCam. Los resultados de este experimento se representan en la Figura 32. Además, se obtuvieron imágenes de los tumores por microscopía confocal.

20 **[0390]** Se determinó un valor umbral de fluorescencia de 45 a 50 (intensidad de fluorescencia = 0 <255) que representaba con la mayor exactitud la densidad de área de la tinción con CD31 y  $\alpha$ -SMA en imágenes microscópicas de fluorescencia de carcinoma pulmonar de Lewis (espesor de la sección 80  $\mu$ m). Valores medios para la densidad de área (% de la media del área superficial del tumor  $\pm$  E.E; n= 3-5 ratones por grupo) para vasos sanguíneos teñidos con CD31 y membrana basal teñida con colágeno tipo IV.

Tabla 18

| Tratamiento | Media de CD31 | E.E. de CD31 | Media de colágeno IV | E.E. de colágeno IV |
|-------------|---------------|--------------|----------------------|---------------------|
| Vehículo    | 100,00        | 9,09         | 100,00               | 2,06                |
| ARC308      | 51,91         | 5,70         | 90,99                | 3,47                |
| ARC594      | 37,31         | 4,18         | 85,14                | 2,58                |

30 **[0391]** La significancia de la diferencia entre grupos se evaluó usando ANOVA seguido de prueba de Fisher a posteriori para comparaciones múltiples como se muestra en la siguiente Tabla 19.

Tabla 19:

| PLSD de Fisher para el % de efecto: | Diferencias de medias | de las diferencias | Diferencias críticas | Valor p  |
|-------------------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|----------|
| Nivel de significancia:             |                       |                    |                      |          |
| ARC308-CD31, Veh-                   | -                     |                    | 15,3                 | <0,000 S |
| ARC594-CD31. Veh-                   | -                     |                    | 16,2                 | <0,000 S |
| ARC308-CD31, ARC594-                | 14,6                  |                    | 15,3                 | 0,0      |
| ARC308-col IV, ARC594-              | 5,8                   |                    | 15,3                 | 0,4      |
| ARC308-Co                           | -                     |                    | 14,5                 | 0,2      |
| ARC594-col IV, Veh-                 | -                     |                    | 15,3                 | 0,0      |

35 **[0392]** Estos resultados indican que la inhibición de PDGF-B conduce a una disminución en la densidad de vasos sanguíneos con efectos menores sobre la membrana basal vascular. ARC308 y ARC594 redujeron el 48% y el 63%, respectivamente, la densidad de área de vasos sanguíneos, que indica que ARC594 era más eficaz que ARC 308 en las condiciones del experimento. Aunque el efecto de la inhibición de PDGF-B sobre el colágeno tipo IV fue relativamente pequeño (9% y 15%, respectivamente, con ARC308 y 594), la reducción en el colágeno tipo IV producida por ARC594 fue significativa. Aunque no se desea ceñirse a ninguna teoría, este efecto puede indicar un

efecto secundario sobre la membrana basal vascular.

Tinción de combinación de anticuerpos anti-CD31, anti-PDGFR-β, anti-α-SMA, anti-NG2 y anti-desmina

5 **[0393]** Secciones de tumores en ratones que se habían tratado con vehículo, ARC308 o ARC594 se cortaron (80 μm) y se tiñeron con anticuerpos anti-CD31 y anti-PDGFR-β, anti-CD31 y anti-α-SMA, anti-CD31 y anti-NG2 o anticuerpos anti-CD31 y anti-desmina. La expresión de pericitos se midió usando Cool Cam y también se tomaron imágenes confocales.

10 **[0394]** Se determinó un valor umbral de fluorescencia de 40-50 que representaba con la mayor exactitud las inmunorreactividades de CD31, PDGFR-β, α-SMA, NG2 y desmina de carcinoma pulmonar de Lewis en las imágenes digitales del experimento (secciones de 80 μm de espesor).

15 **[0395]** Los resultados se presentan en la Figura 33 y se resumen en la siguiente Tabla 20. Los valores son densidades de área medias ± E.E. (n = 4-5 ratones por grupo) expresados como el % de vehículo. La significancia de diferencias entre grupos se evaluó usando ANOVA seguido de prueba de Fisher a posteriori para comparaciones múltiples.

**Tabla 20:**

| Tratamiento | Media de CD31 | E.E. de CD31 | Media de PDGFR-beta | E.E. de PDGFR-beta | Media de alfa-SMA | E.E. de alfa-SMA |
|-------------|---------------|--------------|---------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| Vehículo    | 100,00        | 9,09         | 100,00              | 3,59               | 100,00            | 6,37             |
| ARC308      | 51,91         | 5,70         | 47,04               | 4,53               | 25,01             | 6,14             |
| ARC594      | 37,31         | 4,18         | 27,18               | 3,75               | 17,64             | 2,81             |

| Tratamiento | Media de NG2 | E.E. de NG2 | Media de desmina | E.E. de desmina | Recuento |
|-------------|--------------|-------------|------------------|-----------------|----------|
| Vehículo    | 100,00       | 10,26       | 100,00           | 13,97           | 3 a 5    |
| ARC308      | 20,12        | 2,41        | 15,60            | 2,61            | 5        |
| ARC594      | 11,10        | 1,87        | 9,82             | 1,79            | 4 a 5    |

20 **[0396]** La significancia de diferencias entre grupos se evaluó usando ANOVA seguido de prueba de Fisher a posteriori para comparaciones múltiples como se muestra en la siguiente Tabla 21 (AX101 se refiere a ARC308 y AX102 se refiere a ARC594 en la siguiente Tabla 20, además de en cualquier sitio usado en la presente solicitud y figuras).

25

**Tabla 21:**

**PLSD de Fisher para el % de vehículo**

**Efecto: Grupo**

**Nivel de significancia: 5%**

|                              | Diferencias medias | Diferencias críticas | Valor p |          |
|------------------------------|--------------------|----------------------|---------|----------|
| AX101-CD31, Veh-CD31         | -48,09             | 15,38                | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX102-CD31, Veh-CD31         | -62,69             | 16,22                | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX101-CD31, AX102-CD31       | 14,61              | 15,38                | 0,06    |          |
| AX101-APB5, Veh-APB5         | -52,96             | 15,38                | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX102-APB5, Veh-APB5         | -72,82             | 15,38                | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX101-APB5, AX102-APB5       | 19,86              | 14,50                | 0,01    | <b>S</b> |
| AX101-SMA, Veh-SMA           | -74,99             | 16,75                | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX102-SMA, Veh-SMA           | -82,36             | 17,52                | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX101-SMA, AX102-SMA         | 7,37               | 15,38                | 0,34    |          |
| AX101-NG2, Veh-NG2           | -79,88             | 15,38                | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX102-NG2, Veh-NG2           | -88,90             | 15,38                | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX101-NG2, AX102-NG2         | 9,02               | 14,50                | 0,22    |          |
| AX101-desmina, Veh-desmina   | -84,40             | 15,38                | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX102-desmina, Veh-desmina   | -90,18             | 16,22                | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX101-desmina, AX102-desmina | 5,78               | 15,38                | 0,46    |          |

30 **[0397]** Estos resultados indican que la tratamiento con el aptámero de PDGF-B 308 ó 594 (50 mg/kg, ip, al día durante 7 días) disminuyó la densidad de vasos sanguíneos nada menos que el 63% y produjo una reducción incluso mayor en pericitos, con disminuciones del 73, 82, 89 y el 90% encontradas con tres marcadores inmunohistoquímicos (PDGFR-β, α-actina de músculo liso, NG2 y desmina, respectivamente). Las imágenes confocales confirmaron estos hallazgos y se mostró que el tratamiento con aptámero dejó algunos vasos tumorales sin pericitos y otros con pericitos que estuvieron más estrechamente asociados a células endoteliales que los encontrados en tumores sin tratar.

35

Colocalización de marcadores de CD31, PDGFR-beta,  $\alpha$ -SMA, NG2 y desmina

[0398] Secciones de tumores tratadas con vehículo o ARC594 se cortaron (20  $\mu$ m) y se tiñeron con: anticuerpos anti-CD31 y anti-PDGFR-beta, anticuerpos anti-CD31 y anti- $\alpha$ -SMA, anticuerpos anti-CD31 y anti-NG2 y anticuerpos anti-CD31 y anti-desmina. Luego se midió el grado de colocalización de pericitos con células endoteliales en imágenes digitales de Cool Cam.

[0399] Se determinó un valor umbral de fluorescencia de 40-50 que representaba con la mayor exactitud las densidades de área de CD31 y NG2 de carcinoma pulmonar de Lewis en las imágenes digitales del experimento (secciones de 20  $\mu$ m de espesor).

[0400] Los resultados se representan en el gráfico de la Figura 34 y se resumen en la siguiente Tabla 22. Los valores son colocalización en porcentaje  $\pm$  E.E. (n = 4 por grupo).

**Tabla 22:**

| Colocalización | Media de CD31-PDGFR | E.E. de CD31-PDGFR | Media de CD31-SMA     | E.E. de CD31-SMA     |          |
|----------------|---------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|----------|
| Vehículo       | 40,01               | 2,00               | 47,27                 | 2,27                 |          |
| ARC594         | 19,11               | 3,34               | 8,42                  | 1,13                 |          |
| Colocalización | Media de CD31-NG2   | E.E. de CD31-NG2   | Media de CD31-desmina | E.E. de CD31-desmina | Recuento |
| Vehículo       | 50,68               | 1,42               | 39,67                 | 1,68                 | 4        |
| ARC594         | 4,82                | 0,50               | 6,11                  | 0,88                 | 4        |

[0401] La significancia de diferencias entre grupos se evaluó usando ANOVA seguido de prueba de Fisher a posteriori para comparaciones múltiples, mostrada en la siguiente Tabla 23.

**Tabla 23:**

**PLSD de Fisher para colocalización**

**Efecto: Grupo**

**Nivel de significancia: 5%**

|                            | Diferencias medias | Diferencias críticas | Valor p |          |
|----------------------------|--------------------|----------------------|---------|----------|
| AX102-PDGFR, Veh-PDGFR     | -20,90             | 5,43                 | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX102-SMA, Veh-SMA         | -38,85             | 5,43                 | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX102-NG2, Veh-NG2         | -45,86             | 5,43                 | <0,0001 | <b>S</b> |
| AX102-desmina, Veh-desmina | -33,57             | 5,43                 | <0,0001 | <b>S</b> |

[0402] Estos resultados indican que en carcinoma pulmonar de Lewis bajo condiciones de referencia aproximadamente la mitad de la superficie endotelial de vasos sanguíneos estaba cubierta por pericitos (40-51%). Sin embargo, cuando los tumores se trataron durante 7 días con ARC594, el número de vasos tumorales se redujo ~ 60%, y la cobertura de pericitos de los vasos tumorales supervivientes se redujo al 5-19%. Estos hallazgos indican que la mayoría de los vasos tumorales que sobrevivieron al tratamiento con aptámero de PDGF-B carecen de pericitos. Sin embargo, una cierta fracción de los vasos tumorales se revistieron con pericitos que presentaban un fenotipo "normalizado" con respecto a interacciones de pericitos-células endoteliales. La supervivencia de vasos tumorales envueltos por pericitos se normalizó en el sentido de que los pericitos estaban más estrechamente asociados a células endoteliales que en tumores sin tratar. Este efecto de ARC594 es muy diferente del efecto de los inhibidores de señalización de VEGF, en los que la mayoría de los vasos tumorales supervivientes están cubiertos por pericitos. Los datos presentados en este documento indican que el tratamiento de tumores sólidos con agentes anti-PDGF-B tales como ARC594 produce la supervivencia de al menos dos tipos de vasos tumorales, 1) aquellos con pocos a ningún pericito unido a o revistiendo la pared del vaso, y 2) aquellos que presentan un fenotipo más normalizado con pericitos más estrechamente asociados. Estos resultados sugieren que el uso de agentes anti-PDGF-B, tales como ARC594, puede alterar la vasculatura tumoral haciendo así que los vasos restantes sean más susceptibles a tratamiento con una combinación de agentes tales como agentes anti-VEGF, agentes antivascuales, otros agentes antiangiogénicos o agentes citotóxicos. Por tanto, la terapia de combinación de un aptámero de PDGF (por ejemplo, PDGF-B) en combinación con terapias contra el cáncer conocidas es un procedimiento eficaz para tratar una variedad de tumores sólidos.

[0403] Las imágenes de carcinoma pulmonar de Lewis tratado con aptámero sugieren que los pericitos no están uniformemente distribuidos sobre los vasos tumorales supervivientes. Parece que el resto de vasos carece de cobertura de pericitos (más común) o parece que tiene una densa cobertura de pericitos (menos común).

Colocalización de CD31 y NG2 en vasos tumorales individuales

5 **[0404]** Secciones de 20 µm de carcinomas pulmonares de Lewis tratados con tanto vehículo como ARC594 se tiñeron con anticuerpos anti-CD31 y anti-NG2. El grado de colocalización de pericitos con células endoteliales se midió en imágenes digitales con CoolCam. Los vasos individuales se examinaron en las imágenes para determinar la distribución de vasos cubiertos con pericitos o vacíos de pericitos.

10 **[0405]** Se determinó un valor umbral de 40-50 que representaba con la mayor exactitud las densidades de área de CD31 y NG2 en carcinoma pulmonar de Lewis (las secciones tuvieron 20 µm de espesor). Los resultados se representan en el gráfico de la Figura 35 y se resumen en la siguiente Tabla 24. Los valores son colocalización en porcentaje (n = 3 ratones por grupo, 12-15 vasos por ratón).

**Tabla 24:**

| Distribución                            | Número de vasos en ese intervalo |           |
|-----------------------------------------|----------------------------------|-----------|
| Eje x = intervalo de colocalización (%) | Vehículo                         | ARC594    |
| 0-9                                     | 0                                | 34        |
| 10-19                                   | 0                                | 1         |
| 20-29                                   | 1                                | 2         |
| 30-39                                   | 6                                | 0         |
| 40-49                                   | 5                                | 0         |
| 50-59                                   | 10                               | 0         |
| 60-69                                   | 12                               | 0         |
| 70-79                                   | 5                                | 5         |
| 80-89                                   | 2                                | 1         |
| 90-100                                  | 1                                | 1         |
| <b>Vasos totales examinados</b>         | <b>42</b>                        | <b>44</b> |

15 **[0406]** Estos resultados indican que en carcinoma pulmonar de Lewis bajo condiciones de referencia hay una distribución homogénea de cobertura de pericitos sobre vasos tumorales sanguíneos. Sin embargo, el tratamiento con ARC594 durante siete días afecta esta distribución y se detectan vasos cubiertos con muy pocos pericitos o vasos que están cubiertos con pericitos. Sin embargo, prácticamente no hay nada entre medias.

20 Ejemplo 16: Respuesta a dosis de ARC594 en modelo de carcinoma pulmonar de Lewis de ratón

25 **[0407]** Un trozo de 1 mm<sup>3</sup> de carcinoma pulmonar de Lewis se implantó bajo la piel dorsal de ratones C57BL/6 naturales y se dejó que creciera. Empezando en el día cinco después de la implantación, cinco ratones se trataron durante siete días, intraperitonealmente, del siguiente modo: cinco ratones se trataron con vehículo (solución salina) una vez al día, cinco ratones se trataron con el aptámero ARC594 a 2 mg/kg, una vez al día, cinco ratones se trataron con ARC594 a 10 mg/kg una vez al día, y cinco ratones se trataron con ARC594 a 50 mg/kg una vez al día. Al final del periodo de siete días, cada uno de los ratones se anestesió, y los siguientes tejidos se fijaron por perfusión vascular, se extrajeron y se congelaron para seccionar en el crióstato: tumor (carcinoma pulmonar de Lewis), páncreas, hígado, riñón, tráquea, bazo, yeyuno, corazón, cerebro y tiroides. Las secciones de tumores se cortaron y se tiñeron con anticuerpos dirigidos contra marcadores como se describe más adelante. Se obtuvieron imágenes de microscopía de fluorescencia digital para las mediciones de la densidad de área usando imágenes de CoolCam. Además, se obtuvieron imágenes de los tumores por microscopía confocal.

35 Tinción con anticuerpo anti-CD31 y anti-colágeno tipo IV

40 **[0408]** Secciones de 80 µm de carcinoma pulmonar de Lewis se tiñeron con anticuerpos anti-CD31 y anti-colágeno tipo IV. Se determinó un valor umbral de fluorescencia de 40 que representaba con la mayor exactitud la densidad de área de inmunorreactividades de CD31 y colágeno tipo IV en carcinoma pulmonar de Lewis (espesor de la sección 80 µm). Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 36 y se resumen en la siguiente Tabla 25. Los valores son densidades de área medias ± E.E.; (n= 3-5 ratones por grupo) expresados como el % del valor medio para el vehículo.

**Tabla 25:**

| Tratamiento        | Media de CD31 | E.E. de CD31 | Media de colágeno IV | E.E. de colágeno IV | Recuento |
|--------------------|---------------|--------------|----------------------|---------------------|----------|
| Vehículo           | 100           | 5,96         | 100                  | 3,64                | 5        |
| 2 mg/kg de ARC594  | 77,16         | 9,27         | 95,11                | 8,03                | 3        |
| 10 mg/kg de ARC594 | 60,67         | 4,35         | 97,68                | 4,72                | 3        |
| 50 mg/kg de ARC594 | 39,14         | 2,65         | 81,55                | 2,58                | 5        |

45 **[0409]** La significancia de diferencias entre grupos se evaluó usando ANOVA seguido de prueba de Fisher a

posteriori para comparaciones múltiples como se muestra en la siguiente Tabla 26:

**Tabla 26:**

**PLSD de Fisher para el % de vehículo**

**Efecto: Grupo**

**Nivel de significancia: 5%**

|                                        | <b>Diferencias medias</b> | <b>Diferencias críticas</b> | <b>Valor p</b> |          |
|----------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------|----------|
| 10 mg/kg de CD31, 2 mg/kg de CD31      | -16,49                    | 15,75                       | 0,04           | <b>S</b> |
| 10 mg/kg de CD31, 50 mg/kg de CD31     | 21,53                     | 13,31                       | 0,00           | <b>S</b> |
| 10 mg/kg de CD31, Veh-CD31             | -39,33                    | 13,64                       | <0,0001        | <b>S</b> |
| 2 mg/kg de CD31, 50 mg/kg de CD31      | 38,03                     | 13,31                       | <0,0001        | <b>S</b> |
| 2 mg/kg de CD31, Veh-CD31              | -22,84                    | 13,64                       | 0,00           | <b>S</b> |
| 10 mg/kg de col IV, 2 mg/kg de col IV  | 2,56                      | 15,75                       | 0,74           |          |
| 10 mg/kg de col IV, 50 mg/kg de col IV | 16,13                     | 13,31                       | 0,02           | <b>S</b> |
| 10 mg/kg de col IV, Veh-col IV         | -2,32                     | 13,31                       | 0,73           |          |
| 2 mg/kg de col IV, 50 mg/kg de col IV  | 13,57                     | 13,31                       | 0,05           | <b>S</b> |
| 2 mg/kg de col IV, Veh-col IV          | -4,89                     | 13,31                       | 0,46           |          |

**[0410]** Los resultados indican que la reducción de vasos sanguíneos inducida por la inhibición de PDGF-B depende de la dosis. La magnitud de la disminución en vasos sanguíneos inmunorreactivos de CD31 aumentó con la dosis de ARC594. La reducción en la inmunorreactividad del colágeno tipo IV sólo se observó a la mayor dosis (50 mg/kg i.p., al día durante 7 días).

Tinción con anticuerpo anti-CD31 y anti- $\alpha$ -SMA

**[0411]** Secciones de 80  $\mu$ m de carcinoma pulmonar de Lewis se tiñeron con anticuerpos anti-CD31 y anti- $\alpha$ -SMA. Se determinó un valor umbral de 40 que representaba con la mayor exactitud la densidad de área de inmunorreactividades de CD31 y  $\alpha$ -SMA en carcinoma pulmonar de Lewis (espesor de la sección 80  $\mu$ m). Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 37 y se resumen en la siguiente Tabla 27. Los valores son densidades de área medias  $\pm$  E.E; (n= 3-5 ratones por grupo) expresados como el % del valor medio para el vehículo.

**Tabla 27:**

| <b>Tratamiento</b>        | <b>Media de CD31</b> | <b>E.E. de CD31</b> | <b>Media de SMA</b> | <b>E.E. de SMA</b> | <b>Recuento</b> |
|---------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| <b>Vehículo</b>           | 100                  | 5,96                | 100                 | 4,44               | 5               |
| <b>2 mg/kg de ARC594</b>  | 77,16                | 9,27                | 31,44               | 4,52               | 3               |
| <b>10 mg/kg de ARC594</b> | 60,67                | 4,35                | 19,47               | 3,74               | 3               |
| <b>50 mg/kg de ARC594</b> | 39,14                | 2,65                | 16,57               | 2,06               | 5               |

**[0412]** La significancia de diferencias entre grupos se evaluó usando ANOVA seguido de prueba de Fisher a posteriori para comparaciones múltiples como se muestra en la siguiente Tabla 28:

**Tabla 28:**

**PLSD de Fisher para el % de vehículo**

**Efecto: Grupo**

**Nivel de significancia: 5%**

|                                  | <b>Diferencias medias</b> | <b>Diferencias críticas</b> | <b>Valor p</b> |          |
|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------|----------|
| 10 mg/kg de SMA, 2 mg/kg de SMA  | -11,97                    | 15,75                       | 0,13           |          |
| 10 mg/kg de SMA, 50 mg/kg de SMA | 2,89                      | 13,31                       | 0,66           |          |
| 10 mg/kg de SMA, Veh-SMA         | -80,53                    | 14,09                       | <,0001         | <b>S</b> |
| 2 mg/kg de SMA, 50 mg/kg de SMA  | 14,87                     | 13,31                       | 0,03           | <b>S</b> |
| 2 mg/kg de SMA, Veh-SMA          | -68,56                    | 14,09                       | <,0001         | <b>S</b> |
| 50 mg/kg de SMA, Veh-SMA         | -83,43                    | 11,30                       | <,0001         | <b>S</b> |

**[0413]** Los resultados indican una reducción significativa en pericitos inmunorreactivos de  $\alpha$ -SMA incluso a la dosis más baja (2 mg/kg i.p., al día durante 7 días). Mayores concentraciones de ARC594 tuvieron eficacia elevada.

Colocalización de CD31 y múltiples marcadores de pericitos

**[0414]** Secciones de 20  $\mu$ m de carcinoma pulmonar de Lewis de ratones tratados con vehículo o 2, 10 ó 50 mg/kg de ARC594 como se ha descrito anteriormente se tiñeron con anticuerpos anti-CD31 y anti- $\alpha$ -SMA o anti-CD31 y anti-NG2. El grado de colocalización de pericitos con células endoteliales se midió en imágenes digitales con CoolCam.

**[0415]** Un valor umbral de 40-50 representó con la mayor exactitud las densidades de área de CD31- $\alpha$ -SMA y CD31-NG2 en carcinoma pulmonar de Lewis (las secciones tuvieron 20  $\mu$ m de espesor). Los resultados se representan en la Figura 38 y se resumen en la siguiente Tabla 29. Los valores son colocación media  $\pm$  E.E. (n = 2-5 ratones por grupo).

**Tabla 29:**

| Tratamiento        | Media de CD31-SMA | E.E. de CD31-SMA | Media de CD31-NG2 | E.E. de CD31-NG2 | Recuento |
|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|----------|
| Vehículo           | 54,44             | 1,67             | 48,79             | 0,72             | 2        |
| 2 mg/kg de ARC594  | 18,40             | 1,46             | 14,01             | 1,73             | 3        |
| 10 mg/kg de ARC594 | 16,30             | 1,28             | 12,33             | 1,22             | 5        |
| 50 mg/kg de ARC594 | 7,15              | 0,68             | 6,69              | 0,20             | 4        |

**[0416]** La significancia de diferencias entre grupos se evaluó usando ANOVA seguido de prueba de Fisher a posteriori para comparaciones múltiples como se muestra en la Tabla 30.

**Tabla 30:**

**PLSD de Fisher para el % de colocación**

**Efecto: Grupo**

**Nivel de significancia: 5%**

|                                            | Diferencias medias | Diferencias críticas | Valor p | S |
|--------------------------------------------|--------------------|----------------------|---------|---|
| 2 mg/kg de CD31-SMA, 50 mg/kg de CD31-SMA  | 11,253             | 3,444                | <0,0001 | S |
| 2 mg/kg de CD31-SMA, VehCD31-SMA           | -36,037            | 4,117                | <0,0001 | S |
| 10 mg/kg de CD31-SMA, VehCD31-SMA          | -38,137            | 4,117                | <0,0001 | S |
| 10 mg/kg de CD31-SMA, 50 mg/kg de CD31-SMA | 9,153              | 3,444                | <0,0001 | S |
| 10 mg/kg de CD31-SMA, 2 mg/kg de CD31-SMA  | -2,1               | 3,682                | 0,2464  |   |
| 50 mg/kg de CD31-SMA, VehCD31-SMA          | -47,29             | 3,906                | <0,0001 | S |
| 2 mg/kg de CD31-NG2, 50 mg/kg de CD31-NG2  | 7,318              | 3,444                | 0,0003  | S |
| 2 mg/kg de CD31-NG2, VehCD31-NG2           | -34,784            | 4,117                | <0,0001 | S |
| 10 mg/kg de CD31-NG2, 2 mg/kg de CD31-NG2  | -1,678             | 3,293                | 0,2986  |   |
| 10 mg/kg de CD31-NG2, 50 mg/kg de CD31-NG2 | 5,64               | 3,025                | 0,001   | S |
| 10 mg/kg de CD31-NG2, VehCD31-NG2          | -36,462            | 3,773                | <0,0001 | S |
| 50 mg/kg de CD31-NG2, VehCD31-NG2          | -42,102            | 3,906                | <0,0001 | S |

**[0417]** Estos resultados indican que en carcinoma pulmonar de Lewis tratado durante 7 días con 2 mg/kg de ARC594 el número de vasos tumorales sólo se redujo ~ 23%, pero la cobertura de pericitos se redujo al 14-18%.

Después de tratamiento con 10 mg/kg de ARC594, el número de vasos tumorales se redujo ~ 40% y la cobertura de pericitos se redujo al 12-16%. Aunque no se desea ceñirse a ninguna teoría, estos hallazgos indican que ARC594 reduce primero el número de pericitos que abandonan los vasos sanguíneos restantes tanto desnudos como con reducida cobertura de pericitos y en segundo lugar reduce el número de vasos sanguíneos, probablemente por la reducción de pericitos de sostén y estroma de células de la membrana basal.

**[0418]** A la dosis más baja, la supervivencia de vasos tumorales supervivientes envueltos por pericitos se normalizó en el sentido de que los pericitos estuvieron más estrechamente asociados a células endoteliales que en tumores sin tratar.

**[0419]** Los hallazgos del estudio de respuesta a dosis confirman que ARC594 actúa en múltiples niveles. Aunque no se desea ceñirse a ninguna teoría, estos resultados proporcionan una fuerte evidencia de que la acción primaria de ARC594 produce la reducción en número de pericitos (cuya función es soportar la red de capilares que suministra sangre y nutrientes al tumor). De nuevo, aunque no se desea ceñirse a ninguna teoría, la reducción en vasos sanguíneos podría ser indirecta debido al bloqueo dependiente del aptámero de PDGF-B de factores de crecimiento derivados de pericitos tumorales y derivados de estroma de tumor tales como VEGF.

Ejemplo 17A: Breve transcurso de tiempo de ARC:594 en el modelo de carcinoma pulmonar de Lewis

**[0420]** Un trozo de 1 mm<sup>3</sup> de carcinoma pulmonar de Lewis se implantó bajo la piel dorsal de ratones C57BL/6 naturales y, luego empezando en el día 6, se trató durante 7 días con vehículo o 50 mg/kg de ARC594, según el siguiente protocolo:

n= 4 ratones tratados con vehículo (solución salina i.p., una vez al día) durante 7 días,

n= 4 ratones tratados con ARC594 (50 mg/kg, i.p., una vez al día) durante 1 día,

n= 4 ratones tratados con ARC594 (50 mg/kg, i.p., una vez al día) durante 2 días,

n= 4 ratones tratados con ARC594 (50 mg/kg, i.p., una vez al día) durante 4 días,

5 n= 4 ratones tratados con ARC594 (50 mg/kg, i.p., una vez al día) durante 7 días.

[0421] Al final de cada tratamiento, cada grupo de ratones se perfundió y se recogieron el carcinoma pulmonar de Lewis y los diferentes órganos. Se cortaron secciones de 80 µm de carcinomas pulmonares de Lewis y se tiñeron con anticuerpos dirigidos contra diversos marcadores como se describe más adelante. Finalmente, el vaso sanguíneo y la densidad de área de pericitos se determinaron usando la Cool Cam.

10 [0422] Se determinó un valor umbral de 30-50 que representaba con la mayor exactitud la densidad de área de inmunorreactividades de CD31, α-SMA y NG2 en secciones de 80 µm de carcinoma pulmonar de Lewis. Los resultados se presentan en el gráfico de la Figura 39 y se resumen en la siguiente Tabla 31. Los valores son densidades de área medias ± E.E. (n = 3-5 ratones por grupo) expresados como el % del valor medio para el vehículo. La significancia de diferencias entre grupos se evaluó usando ANOVA seguido de prueba de Fisher a posteriori para comparaciones múltiples.

Tabla 31:

| Tratamiento   | Media de CD31 | E.E. de CD31 | Media de SMA | E.E. de SMA | Media de NG2 | E.E. de NG2 | Recuento |
|---------------|---------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------|----------|
| Vehículo      | 100,00        | 3,85         | 100,00       | 5,34        | 100,00       | 6,86        | 4        |
| ARC594 1 día  | 102,77        | 5,39         | 63,83        | 9,14        | 34,83        | 4,72        | 3        |
| ARC594 2 días | 100,41        | 7,36         | 40,64        | 1,96        | 29,92        | 0,83        | 4        |
| ARC594 4 días | 79,75         | 4,02         | 39,80        | 5,96        | 17,73        | 1,83        | 4        |
| ARC594 7 días | 55,17         | 3,55         | 13,64        | 3,90        | 11,64        | 0,27        | 3        |

20 [0423] Estos datos indican que después de un día de tratamiento con ARC594 (50 mg/kg) los pericitos se redujeron el 36% para positivos para α-SMA y el 66% para NG2. Después de 7 días de tratamiento se reducen incluso más (disminución total del 86%-89%). A diferencia, la densidad de área de CD31 está significativamente cambiada hasta después de 4 días de tratamiento con ARC594. Aunque no se desea ceñirse a ninguna teoría, estos resultados proporcionan una fuerte evidencia de que el efecto primario de ARC594 es sobre los pericitos, mientras que el efecto secundario reduce células endoteliales por una reducción en el VEGF derivado de pericitos. Por tanto, bajo estas condiciones de tratamiento con PDGF-B, el efecto neto es reducir la abundancia de pericitos reduciendo así directamente la fuente de VEGF derivados de huésped que a su vez produce una reducción neta en la abundancia de células endoteliales tumorales.

30 [0424] En un estudio similar, carcinomas pulmonares de Lewis tratados con vehículo o ARC594 durante siete días también se tiñeron para la detección de un total de 4 marcadores de pericitos: α-SMA, NG2, PDGFR-β y desmina. Bajo condiciones de referencia, los pericitos expresaron los 4 marcadores. Específicamente, la densidad de área de α-SMA fue el 10,0%, NG2 fue el 14,9%, PDGFR-β fue el 14,0% y desmina fue el 9,0%. En comparación con el carcinoma pulmonar de Lewis tratado con vehículo, el tratamiento con ARC594 durante 1 día produjo una reducción en los 4 marcadores de pericitos (Figura 40). Aunque hubo una reducción significativa en los 4 marcadores después de un día de tratamiento con ARC564, las reducciones en α-SMA (45,4 ± 7,8%) y NG2 (69,8 ± 4,2%) fueron mayores que en PDGF-β (31,3 ± 2,8%) y desmina (25,7 ± 16,0%: Figura 40). Aunque no se desea ceñirse a ninguna teoría, esta reducción desigual en los marcadores de pericitos puede indicar que, aunque se pierden algunos pericitos, los pericitos han cambiado su fenotipo cambiando sus marcadores de expresión. Sin embargo, después de 7 días de tratamiento con ARC594, los 4 marcadores de pericitos se redujeron el 70-80% (Figura 40), dejando así vasos tumorales sanguíneos desnudos de pericitos 7 días. La obtención de imágenes confocales confirmó estos resultados.

45 Ejemplo 17B: Largo transcurso de tiempo de ARC594 en el modelo de carcinoma pulmonar de Lewis

[0425] Un trozo de 1 mm<sup>3</sup> de carcinoma pulmonar de Lewis se implantó bajo la piel dorsal de ratones C57BL/6 naturales (día 0). Empezando en el día 6, los ratones se trataron durante 7-14-28 días con vehículo o 50 mg/kg de ARC594, según el siguiente protocolo:

n= 5 ratones tratados con vehículo (solución salina i.p., una vez al día) durante 7 días,

n= 5 ratones tratados con ARC594 (50 mg/kg, i.p., una vez al día) durante 7 días,

55 n= 6 ratones tratados con vehículo (solución salina i.p., una vez al día) durante 14 días,

n= 6 ratones tratados con ARC594 (50 mg/kg, i.p., una vez al día) durante 14 días,

n= 6 ratones tratados con vehículo (solución salina i.p., una vez al día) durante 28 días,

n= 6 ratones tratados con ARC594 (50 mg/kg, i.p., una vez al día) durante 28 días.

[0426] Durante el tratamiento, los ratones se pesaron diariamente y el tamaño del tumor se monitorizó. El tamaño del tumor se midió con compases calibradores cada dos días durante el tratamiento. El volumen del tumor se calculó usando la siguiente fórmula: Volumen del tumor =  $(0,52 \cdot \text{ancho}^2) \cdot \text{longitud}$ . Los tumores también se pesaron al final del experimento.

Crecimiento del tumor y del ratón

[0427] El crecimiento del tumor (como se representa por el volumen del tumor) durante el tratamiento se representa en la Figura 41. El peso del tumor durante el tratamiento se representa en la Figura 42. El crecimiento del ratón durante el tratamiento se muestra en la Figura 43.

[0428] El tratamiento con ARC594 no afectó el tamaño del tumor de carcinoma pulmonar de Lewis: las curvas de crecimiento para los tumores tratados con ARC594 (50 mg/kg) y vehículo son las mismas. Además, no hubo diferencia significativa en los pesos del tumor medidos al final del experimento. Sin embargo, pareció que los ratones tratados con ARC594 ganaban más peso en la tercera y cuarta semana de tratamiento.

Tinción con anticuerpos anti-CD31 y anti-NG2

[0429] Se determinó un valor umbral de 40-50 que representaba con la mayor exactitud la densidad de área de las inmunorreactividades de CD31 y NG2 en secciones de 80 µm de carcinoma pulmonar de Lewis. Los resultados se representan en la Figura 44 y se resumen en la siguiente Tabla 32: Los valores están normalizados a las densidades de área medias ± E.E. (n = 1-5 ratones por grupo) expresados como el % del valor medio para el vehículo. AX102 se refiere a ARC594. La significancia de diferencias entre grupos se evaluó usando ANOVA seguido de prueba de Fisher a posteriori para comparaciones múltiples.

**Tabla 32:**

| Tratamiento        | Media de CD31 | E.E. de CD31 | Media de NG2 | E.E. de NG2 | Recuento |
|--------------------|---------------|--------------|--------------|-------------|----------|
| Vehículo 1 semana  | 100,0         | 2,0          | 100,0        | 2,1         | 4        |
| AX102 1 semana     | 59,3          | 4,9          | 22,2         | 3,0         | 5        |
| Vehículo 2 semanas | 107,1         | 5,8          | 94,1         | 8,3         | 5        |
| Ax102 2 semanas    | 40,5          | 4,2          | 18,2         | 3,4         | 4        |
| Vehículo 3 semanas | 101,4         |              | 100,3        |             | 1        |
| Ax102 3 semanas    | 39,9          | 1,2          | 15,4         | 1,5         | 3        |
| Vehículo 4 semanas | 98,9          | 2,4          | 113,6        | 7,5         | 3        |
| Ax 102 4 semanas   | 15,0          | 0,2          | 14,9         | 1,4         | 2        |

[0430] En el carcinoma pulmonar de Lewis tratado con vehículo, la densidad de área de CD31 no cambió. La densidad de área de NG2 de carcinoma pulmonar de Lewis tratado con vehículo siguió aproximadamente la misma después de las semanas 1, 2 y 3 de tratamiento, aunque aumentó algo después de la semana 4 de tratamiento. Esta diferencia sólo fue estadísticamente significativa cuando se comparó con los puntos de tiempo de la semana 2 y la semana 4.

[0431] En carcinoma pulmonar de Lewis tratado con ARC594 (50 mg/kg), la densidad de área de CD31 disminuyó el 40% en comparación con el vehículo después de una semana, el 60% después de dos semanas, permaneció igual después de tres semanas y disminuyó el 85% después de cuatro semanas. En carcinoma pulmonar de Lewis tratado con ARC594, la densidad de área de NG2 disminuyó el 80% después de una semana y después permaneció casi la misma. Estos datos muestran que el tratamiento con ARC594 reduce la densidad de área de NG2 más rápido que la densidad de área de CD31.

[0432] En un estudio similar, secciones de carcinoma pulmonar de Lewis que se habían tratado con ARC594 durante 28 días se tiñeron con anticuerpos anti-CD31 y anti-PDGFR-beta. Aunque el tratamiento con ARC594 produjo una reducción inmediata de pericitos después de 1 día de tratamiento, la densidad de área de vasos tumorales no cambió. Sin embargo, el tratamiento adicional reveló que hubo una reducción observada en vasos tumorales a los 7 días - una tendencia que continuó durante los 28 días de tratamiento. La cuantificación de la densidad de área de CD31 reveló que después de 4 días de tratamiento los vasos tumorales sanguíneos se redujeron significativamente el 31,3% en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 45). Los vasos tumorales se redujeron progresivamente el 46,5% después de 7 días de tratamiento y el 79,9% después de 28 días de tratamiento (Figura 45).

[0433] La Figura 45 ilustra una reducción adicional en vasos tumorales, pero no en pericitos positivos para PDGFR-beta con tratamiento de ARC594 adicional durante 28 días. Los vasos tumorales de ratones tratados con vehículo se cubrieron el 48,6% por pericitos, mientras que el resto de los vasos después del tratamiento con

ARC594 durante 7 días sólo se cubrieron el 19,1% por pericitos (Figura 46). Después del tratamiento con ARC594 durante 28 días, que reduce adicionalmente los vasos tumorales, el resto de los vasos tumorales sanguíneos se cubrieron el 40,1% por pericitos (Figura 46).

5 **[0434]** Los resultados previos indicaron que los vasos sanguíneos desnudos fueron los afectados por el tratamiento con ARC594 durante 28 días. Para determinar si los vasos afectados eran los que carecían de pericitos se examinó la distribución de CD31 y PDGFR-beta sobre vasos individuales. En el CPL tratado con vehículo, la mayoría de los vasos están cubiertos por pericitos, encontrándose la mayoría de los vasos entre el 40% y el 90% de cobertura (Figura 47). Después de 7 días de tratamiento, menos vasos sobrevivieron y el resto de los vasos se cubrieron por pocos o ningún pericito (<40% de cobertura; Figura 47). El tratamiento adicional con ARC594 durante 10 28 días condujo a incluso reducciones adicionales en vasos tumorales. Sin embargo, estos vasos restantes perdieron la población de vasos desnudos observados después de 7 días de tratamiento y de hecho tuvieron una distribución igual de cobertura de pericitos (Figura 47).

15 **[0435]** Se investigó si la reducción en pericitos producida por ARC594 tuvo un efecto sobre el diámetro del vaso o no. El CPL tratado con vehículo tuvo vasos tumorales sanguíneos con un diámetro de 12,8 µm. Sin embargo, el tratamiento con ARC594 aumentó el diámetro a los 4 días (Figura 48) y aumentó adicionalmente a los 14 días (Figura 48). Sin embargo, el tratamiento adicional después de 14 días produjo vasos tumorales que disminuían en diámetro como se muestra en los días 21 y 28. (Figura 48).

20 **[0436]** En un experimento similar se investigó si el tratamiento con ARC594 afectaba o no a la membrana basal. En carcinoma pulmonar de Lewis tratado con vehículo, los vasos positivos para CD31 se envolvieron por el colágeno tipo IV. ARC594 no cambió la cantidad total de colágeno IV después de 1 día de tratamiento, cuando el número de pericitos empezó a disminuir; o después de 4 días de tratamiento, cuando el número de vasos sanguíneos empezó a disminuir. Sin embargo, después de 7 días de tratamiento, la membrana basal vascular empezó gradualmente a disminuir, alcanzando la mayor reducción después de 28 días. De hecho, la densidad de área del colágeno tipo IV se redujo el 20% en el día 7 y el 50% en el día 28 (Figura 49).

30 **[0437]** En un experimento similar también se analizaron cambios en la membrana basal vascular usando dos otros marcadores para los componentes de la membrana basal: nidogen y laminina. La tinción doble con el colágeno tipo IV, o laminina, y nidogen mostró que estos marcadores tienen la misma inmunorreactividad y la membrana basal vascular era positiva para los tres. El análisis de la densidad de área mostró que nidogen y laminina se redujeron del mismo modo que el colágeno tipo IV (Figura 50).

35 Ejemplo 18: Largo transcurso de tiempo de la respuesta a dosis de ARC594 en carcinoma pulmonar de Lewis

**[0438]** Un trozo de 1 mm<sup>3</sup> de carcinoma pulmonar de Lewis (CPL) se implantó bajo la piel dorsal de ratones C57BL/6 de 9 a 10 semanas de edad. El tratamiento empezó 4-6 días después. El aptámero ARC594 (2, 10 ó 50 mg/kg) o vehículo (solución salina) se inyectó ip diariamente durante hasta 28 días. Además, el aptámero de control negativo ARC128 (también denominado en este documento AX 104) (50 mg/kg), que contiene los mismos nucleótidos que ARC594 pero en un orden al azar, se usó para determinar la especificidad de ARC594. Al final del tratamiento los ratones se anestesiaron, se perfundieron con fijador y se recogió el tejido de cada ratón.

45 **[0439]** Para la tinción, las células endoteliales de vasos tumorales, secciones de criostato de 80 µm de espesor de carcinoma pulmonar de Lewis, se tiñeron con anticuerpo anti-CD31 (clon 2H8 Chemicon). Para los pericitos, las secciones se tiñeron con uno o más de cuatro anticuerpos: α-actina de músculo liso (α-SMA, clon 1 A4, Sigma Chemical Co.), proteoglicano de sulfato de condroitina NG2 (AB5320, Chemicon), PDGFR-β (clon APB5, de Akiyoshi Uemura, Universidad de Kioto, Japón) y desmina (DAKO).

50 **[0440]** Las densidades de área de los marcadores de CD31 y pericitos (proporción del área de la sección) se midieron por microscopía de fluorescencia en imágenes adquiridas a 10X. La microscopía de electrones de transmisión de secciones de 50-100 nm se tiñeron con citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico Zeiss EM-10.

55 **[0441]** La cobertura de pericitos se midió en secciones de 20 µm teñidas con marcador de CD31 y de pericitos (α-SMA, NG2, PDGFR-β y desmina). Las imágenes de cada marcador se capturaron por separado y se analizaron por Image J: Después de determinarse el umbral de cada canal, las imágenes se combinaron y los píxeles colocalizados se midieron. La densidad de área se determinó como la proporción de píxeles colocalizados con respecto a píxeles positivos para CD31.

60 Tinción con anticuerpos anti-α-SMA

**[0442]** Los tumores tratados con ARC594 (50 mg/kg), aptámero de control negativo (50 mg/kg) o vehículo durante hasta 7 días se seccionaron y se tiñeron con anticuerpos anti-α-SMA. Como se muestra en la Figura 51, ARC594 disminuyó los pericitos inmunorreactivos de α-SMA en un modo de respuesta a dosis. La Figura 52 muestra que ARC594 (50 mg/kg) redujo los pericitos después de sólo un día de tratamiento. Las imágenes confocales

muestran que el aptámero de control negativo no afectó la vasculatura tumoral.

Ejemplo 19: Respuesta a dosis de ARC594 en el modelo de RIP Tag2

5 **[0443]** Ratones positivos para RIP-Tag2 de 9 semanas de edad se trataron durante 7 días con vehículo, o 2 mg/kg, 10 mg/kg o 50 mg/kg de ARC594, según el siguiente protocolo:

n= 4 ratones tratados con vehículo (solución salina i.p., una vez al día)

10 n= 5 ratones tratados con ARC594 (2 mg/kg, i.p., una vez al día)

n= 5 ratones tratados con ARC594 (10 mg/kg, i.p., una vez al día)

15 n= 5 ratones tratados con ARC594 (50 mg/kg, i.p., una vez al día)

**[0444]** Al final de este tratamiento, los ratones se perfundieron y se recogieron el hígado, bazo, tiroides, tráquea, riñón, yeyuno, corazón, cerebro y páncreas para cada uno ratón. Finalmente se cortaron secciones de 80 µm y se tiñeron para CD31, colágeno tipo IV, PDGFR-beta, α-SMA y NG2.

20 **[0445]** Se determinó un valor umbral de 40 que representaba con la mayor exactitud la densidad de área de inmunorreactividades de CD31 y NG2 en secciones de 80 µm de tumor RIP-Tag2. Los resultados se representan en la Figura 53 y se resumen en la siguiente Tabla 33. Los valores son densidades de área medias ± E.E. (n = 4-5 ratones por grupo) expresados como densidad de área y también como el % del valor medio para el vehículo.

25 **Tabla 33:**

| Tratamiento     | Media de CD31 | E.E. de CD31 | Media de NG2 | E.E. de NG2 | Recuento |
|-----------------|---------------|--------------|--------------|-------------|----------|
| Vehículo        | 100,0         | 4,0          | 100,0        | 1,8         | 4        |
| ARC594 2 mg/kg  | 101,6         | 3,8          | 88,2         | 3,5         | 4        |
| ARC594 10 mg/kg | 93,5          | 2,4          | 72,0         | 2,9         | 5        |
| ARC594 50 mg/kg | 91,6          | 2,3          | 73,5         | 1,1         | 4        |

**[0446]** La significancia de diferencias entre grupos se evaluó usando ANOVA seguido de prueba de Fisher a posteriori para comparaciones múltiples como se muestra en la Tabla 34.

30 **Tabla 34:**

**PLSD de Fisher para la densidad de área**  
**Efecto: Grupo**  
**Nivel de significancia: 5%**

|                                                  | Diferencias medias | Diferencias críticas | Valor p |          |
|--------------------------------------------------|--------------------|----------------------|---------|----------|
| ARC594-2 mg/kg de CD31, veh-CD31                 | 0,86               | 4,52                 | 0,6989  |          |
| ARC 594-2 mg/kg de CD31, ARC594-50 mg/kg de CD31 | 5,509              | 4,52                 | 0,0188  | <b>S</b> |
| ARC594-10 mg/kg de CD31, veh-CD31                | -3,604             | 4,288                | 0,0959  |          |
| ARC594-10 mg/kg de CD31, ARC594-2 mg/kg de CD31  | -4,464             | 4,288                | 0,0419  | <b>S</b> |
| ARC594-10 mg/kg de CD31, ARC594-50 mg/kg de CD31 | 1,045              | 4,288                | 0,6205  |          |
| ARC594-50 mg/kg de CD31, veh-CD31                | -4,649             | 4,52                 | 0,0442  | <b>S</b> |
| ARC594-2 mg/kg de NG2, veh-NG2                   | -5,618             | 4,52                 | 0,0168  | <b>S</b> |
| AARC594-2 mg/kg de NG2, Ax102-50 mg/kg de NG2    | 6,99               | 4,52                 | 0,0038  | <b>S</b> |
| ARC594-10 mg/kg de NG2, veh-NG2                  | -13,306            | 4,288                | <0,0001 | <b>S</b> |
| ARC594-10 mg/kg de NG2, ARC594-2 mg/kg de NG2    | -7,688             | 4,288                | 0,0011  | <b>S</b> |
| ARC594-10 mg/kg de NG2, ARC594-50 mg/kg de NG2   | -0,698             | 4,288                | 0,7405  |          |
| ARC594-50 mg/kg de NG2, veh-NG2                  | -12,608            | 4,52                 | <0,0001 | <b>S</b> |

35 **[0447]** Estos resultados indican que en tumores RIP-Tag2 tratados durante 7 días con 2 mg/kg de ARC594 la densidad de pericitos positivos para NG2 se redujo el 12%. A 10 mg/kg de dosis la reducción fue mayor (28%). La dosis de 50 mg/kg tuvo el mismo efecto que la dosis de 10 mg/kg. ARC594 a 10 mg/kg y 50 mg/kg de dosis inducen el 10% de reducción en vasos tumorales RIP-Tag2.

40 **[0448]** En otro estudio, el tratamiento de tumor RIPTag2 con ARC594 durante 7 días condujo a una reducción en pericitos y esta reducción fue mayor después de 28 días. Los tumores RIP-Tag2 sin tratar están altamente vascularizados. El tratamiento con ARC594 produjo una regresión de vasos sanguíneos (densidad de área de CD31) y esta disminución dependió del tiempo; los vasos sanguíneos empezaron a remitir después de 7 días de tratamiento. La prolongación del tratamiento a 28 días produjo una mayor reducción en vasos sanguíneos. Las mediciones mostraron que el tratamiento de 7 días con ARC594 disminuyó la inmunorreactividad de α-SMA y CD31

el 27,2% y el 12,3%, respectivamente. Después de 14 días, la inmunorreactividad de  $\alpha$ -SMA y CD31 se redujeron el 45,8% y el 26,6%, respectivamente. Después de 28 días, la inmunorreactividad de  $\alpha$ -SMA y CD31 se redujeron el 45,5% y el 38,1%, respectivamente (Figura 54).

5 **[0449]** Los pericitos en tumores RIP-Tag2 estuvieron estrechamente asociados al endotelio. Como se observa en el modelo de carcinoma pulmonar de Lewis, después del tratamiento con ARC594, los pericitos supervivientes se asociaron estrechamente a los vasos sanguíneos, que indica que en este modelo de tumor la inhibición de PDGF-BB indujo cambios fenotípicos de pericitos.

10 Ejemplo 20: Análisis farmacocinético de ARC594 en ratones.

**[0450]** Para los estudios farmacocinéticos descritos en este documento, todos los datos de concentración basados en la masa sólo se refieren al peso molecular de la porción de oligonucleótido del aptámero, independientemente de la masa conferida por la conjugación con PEG.

15 **[0451]** Cada grupo de dosis consistió en 3 ratones que se sacrificaron terminalmente en cada momento de tiempo para la recogida de plasma. El aptámero se formuló para inyección de un polvo liofilizado a una concentración final de 10 mg/ml (peso de oligonucleótido) en 0,9% de solución salina convencional y se esterilizó por filtración (0,2  $\mu$ m) antes de la dosificación. La vía de la administración usada fue una única inyección intravenosa en bolo por la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. En momentos de tiempo especificados, t = pre-dosis, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32 y 48 horas, las muestras de sangre se obtuvieron de catéteres de la vena yugular, se transfirieron directamente a tubos recubiertos de EDTA, se mezclaron por inversión y se colocaron en hielo común. El plasma se recogió por centrifugación de tubos de sangre-EDTA a 3000 rpm durante 5 minutos. Las muestras de plasma se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis. El análisis de muestras de plasma para la concentración de aptámero se llevó a cabo usando una forma de ensayo homogéneo utilizando la adición directa de alícuotas de plasma a pocillos de ensayo que contenían el reactivo de detección de ácidos nucleicos fluorescente comercialmente disponible Oligreen™. Después de un breve periodo de incubación (5 min) a temperatura ambiente, protegidas de la luz, las placas de ensayo se leyeron por un lector de placas de fluorescencia.

30 **[0452]** La señal de fluorescencia de cada pocillo fue proporcional a la concentración de aptámero en el pocillo, y las concentraciones de muestra se calcularon por interpolación de valores de fluorescencia de una curva patrón de concentración de fluorescencia (valores medios de curvas duplicadas). Las concentraciones medias en plasma se obtuvieron en cada momento de tiempo a partir de tres animales en cada grupo. Los datos de concentración en plasma frente al tiempo al que aparecieron se sometieron a un análisis no compartimental (NCA) usando el software de modelado farmacocinético convencional en la industria WinNonLin™ v.4.0. Los cálculos aproximados se obtuvieron para los siguientes parámetros farmacocinéticos primarios: concentración máxima en plasma,  $C_{m\acute{a}x}$ ; área bajo la curva de concentración-tiempo, ABC; semivida terminal,  $t_{1/2}$ ; eliminación terminal, CI; y volumen de distribución en el estado estacionario,  $V_{ss}$ . Los datos de concentración media en plasma frente al tiempo parecieron ser monofásicos con respecto al transcurso de tiempo entero estudiado (0-48 h).

40 **[0453]** El ensayo de unión competitiva previamente descrito se usó para determinar la afinidad de unión y selectividad *in vitro* de ARC594 para diferentes isoformas de PDGF. Las diferentes concentraciones de aptámero competidor sin marcar se valoraron en reacciones separadas contra una cantidad fija (<0,1 nM) de ARC594 radiomarcado con  $^{32}$ P en tampón que contenía una cantidad fija (0,1 nM) de la diana relacionada con el aptámero (PDGF-BB; PeproTech): la versión sin PEGilar de ARC594 se radiomarcó en el extremo 5' por incubación con  $^{32}$ P-ATP (ICN) y cinasa de polinucleótido (NEB). Las reacciones de unión se llevaron a cabo en solución salina tamponada con fosfato (Cellgro) que contenía 0,2 mg/ml de albúmina de suero bovino (NEB) y 0,02 mg/ml de ARNt (Sigma). Las reacciones se equilibraron durante un periodo de 15-30 minutos a temperatura ambiente, luego se filtraron a través de un sándwich de membranas de nitrocelulosa (membrana Protra, Perkin-Elmer) y nailon (membrana Hybond, Amersham) para separar el aptámero unido a diana de aptámero libre. El posterior análisis autorradiográfico de las membranas de filtro correspondiente a cada concentración de aptámero sin marcar reveló el grado de desplazamiento competitivo de  $^{32}$ P-ARC594 por aptámero sin marcar. Los datos se expresaron como la relación de los recuentos por minuto (CPM) de radiactividad debida a  $^{32}$ P-ARC594 unida a PDGF-BB sobre la membrana de nitrocelulosa ( $CPM_{nitrocelulosa}$  o  $CPM_{nc}$ ) con respecto a CPM total ( $CPM_{total} = CPM_{nitrocelulosa} + CPM_{nailon}$ ).

55 **[0454]** De los diferentes ligandos de PDGF, ARC594 tuvo la mayor afinidad por PDGF-BB ( $K_d = 0,09 \pm 0,02$  nM) y PDGF-AB ( $K_d = 0,10 \pm 0,01$  nM), pero no PDGF-AA ( $K_d = 2,6 \pm 0,2$  nM (Figura 55)).

60 **[0455]** Como prueba secundaria de tanto la farmacocinética en plasma como la bioactividad *in vivo* de ARC594, el ensayo de unión por competencia se usó para ensayar las mismas muestras de plasma usadas para generar los datos farmacocinéticos. Se prepararon disoluciones 1:10 seriadas de la muestra de plasma en solución salina tamponada con fosfato (1X PBS) y se mezclaron con una concentración fija de  $^{32}$ P-ARC594, luego se añadieron a PDGF-BB humano. La concentración final de PDGF en cada ensayo fue 0,1 nM, y la concentración final de  $^{32}$ P-ARC594 < 0,1 nM. En este experimento, las muestras de plasma se analizaron comparando con una curva patrón generada con muestras de concentraciones de ARC594 conocidas en 1X PBS. Comparando con los patrones de referencia, la concentración eficaz de aptámero activo podría calcularse en cada muestra de plasma.

65

5 **[0456]** Los resultados de este estudio indican que una dosis de 10 mg/kg de ARC594 tiene una semivida de aproximadamente 4 horas (Figuras 56A y 56B), y el perfil farmacodinámico es según sus datos farmacocinéticos (Figura 57). El perfil de bioactividad de este análisis *ex vivo*, mostrado en la Figura 57, proporciona la verificación de que (1) el aptámero estaba presente y activo en el plasma del modelo de ratón a t = 48 h después de la dosis; y (2) las concentraciones en plasma calculadas a partir del ensayo farmacocinético basado en fluorescencia fueron correctas.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Archemix Corp. y col.
- 5 <120> Aptámeros estabilizados para factor de crecimiento derivado de plaquetas y su uso como agentes terapéuticos oncológicos
- <130> 23239-558A CIP3-061
- 10 <140> Por determinar
- <141> 02/11/2005
- <150> US 10/980.211 <151> 02/11/2004
- 15 <150> US 60/632.358 <151> 30/11/2004
- <150> US 60/632.609 <151> 01/12/2004
- 20 <150> US 60/652.496 <151> 10/02/2005
- <150> US 60/652.494 <151> 11/02/2005
- <150> US 60/667.866 <151> 01/04/2005
- 25 <150> US 60/672.200 <151> 15/04/2005
- <160> 102
- 30 <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 9
- <212> ADN
- 35 <213> Artificial
- <220>
- <223> Aptámero sintético
- 40
- <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (6)..(6)
- 45 <223> uridina es 2'-flúor
- <220>
- <221> base\_modificada
- 50 <222> (8)..(8)
- <223> citidina es 2'-flúor
- <220>
- <221> base\_modificada
- 55 <222> (9)..(9)
- <223> gm
- <400> 1
- 60 caggcuaog 9
- <210> 2
- <211> 12
- 65 <212> ADN

<213> Artificial

5 <220>  
<223> Aptámero sintético

10 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (5)..(5)  
<223> gm

15 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (7)..(7)  
<223> gm

20 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (10)..(10)  
<223> uridina es 2'-flúor

25 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (11)..(11)  
<223> citidina es 2'-flúor

30 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (12)..(12)  
<223> Adenosina es 2'-O-metilo

<400> 2

40 ogtagagcau ca 12

<210> 3  
<211> 8  
<212> ADN  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Aptámero sintético

50 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (5)..(6)  
<223> citidina es 2'-flúor

55 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (7)..(7)  
<223> uridina es 2'-flúor

60 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (8)..(8)

65 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (8)..(8)

<223> gm  
 <400> 3

5     tgatccug     8

<210> 4  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> Aptámero sintético

15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (4)..(4)  
 <223> citidina es 2'-flúor

20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (5)..(5)  
 <223> gm

25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (6)..(6)  
 <223> uridina es 2'-flúor

30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (8)..(8)  
 <223> citidina es 2'-flúor

35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (9)..(9)  
 <223> gm

40

<400> 4

45     cagcguacg     9

<210> 5  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50

<220>  
 <223> Aptámero sintético

55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (7)..(7)  
 <223> gm

60

<220>

65

<221> base\_modificada  
 <222> (10)..(10)  
 <223> uridina es 2'-flúor  
 5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (11)..(11)  
 <223> citidina es 2'-flúor  
 10  
 <220>  
 <221> base\_modificada <222> (12)..(12)  
 <223> Adenosina es 2'-O-metilo  
 15  
 <400> 5  
 ogtaccogatu ca 12  
 20  
 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (6)..(6)  
 <223> citidina es 2'-flúor  
 30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (7)..(7)  
 <223> uridina es 2'-flúor  
 35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (8)..(8)  
 <223> gm  
 <400> 6  
 45  
 tgaagcug 8  
 <210> 7  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(23)  
 <223> Todas las pirimidinas y todas las purinas son 2'-O-metilo  
 60  
 <400> 7  
 augcaguuug agaaguogog cau 23  
 <210> 8

<211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Aptámero sintético

<400> 8

10 caggctaogc gtagagcatc atgatcdg 29

<210> 9  
 <211> 56  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Aptámero sintético

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (10)..(32)  
 <223> De los nucleótidos 10 a 32, todas las purinas (A y G) y todas las pirimidinas (C y U) son 2'-O-metilo

25 <400> 9

caggctaogc ugcaguuuga gaagucogc aucgtagagc atcagaaatg atcctg 56

30 <210> 10  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Aptámero sintético

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (10)..(30)  
 <223> De los nucleótidos 10 a 30, todas las purinas (A y G) y todas las pirimidinas (C y U) son 2'-O-metilo

<400> 10

caggctaogu gcaguuugag aagucogca cgtagagcat cagaaatgat cctg 54

45 <210> 11  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Aptámero sintético

<400> 11 cacaggctac ggcaogtaga gcatcacat gatcctgtg 39

55 <210> 12  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(22)  
 <223> esqueleto de fosforotioato

5 <400> 12

tgactgtgaa cgttggagat ga 22

<210> 13  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)  
 <223> esqueleto de fosforotioato

20 <400> 13

tgaacgttgg agat 14

25

<210> 14  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30

<220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(12)  
 <223> esqueleto de fosforotioato

35 <400> 14

40 aacgttggag at 12

<210> 15  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45

<220>  
 <223> Aptámero sintético

50

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(10)  
 <223> esqueleto de fosforotioato

55 <400> 15

aacgttggag 10

60

<210> 16  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero sintético

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(13)  
 <223> esqueleto de fosforotioato

10 <400> 16  
 gtgaacgttc gag 13

15 <210> 17  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Aptámero sintético

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(24)  
 <223> esqueleto de fosforotioato

<400> 17  
 tctgttttt gtcttttgt cgtt 24

30 <210> 18  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Aptámero sintético

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(18)  
 <223> esqueleto de fosforotioato

<400> 18  
 gtcttttgt cgttttgt 18

45 <210> 19  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Aptámero sintético

55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)  
 <223> esqueleto de fosforotioato

60 <400> 19  
 gtcttttgt cgtt 14  
 <210> 20

<211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (1)..(11)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-11

<220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (44)..(46)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 44-46

<400> 20

20     aacgttgcag caggctacgg caogtagagc atcaccatga tctctgc     46

<210> 21  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero sintético

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-14

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (47)..(49)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 47-49

40 <400> 21

       gtgaaagttc gaggcaggcta oggcaogtag agcatcacca tgatcctgc     49

45 <210> 22  
 <211> 64  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 50 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(23)  
 55 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-23

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (56)..(64)  
 60 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 56-64

<400> 22

ES 2 373 047 T3

```

    tgactgtgaa cgttcgagat gacaggctac ggcacgtaga gcatcaccat gatcctgttt      60
    tttt                                                                           64

<210> 23
<211> 34
5 <212> ADN
   <213> Artificial

<220>
<223> Aptámero sintético

10 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(4)
    <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4

15 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (8)..(13)
    <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 8-13

20 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (31)..(34)
    <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 31-34

25 <400> 23

    caggctaagt ttgtagagca tcacatgat cctg      34

30 <210> 24
    <211> 35
    <212> ADN
    <213> Artificial

35 <220>
    <223> Aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature
40 <222> (1)..(4)
    <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (8)..(14)
    <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 8-14

<220>
<221> misc_feature
50 <222> (32)..(35)
    <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 32-35

<400> 24

55 caggctaagt ttgtagagc atcaccatga tctg      35

<210> 25
<211> 35
<212> ADN
60 <213> Artificial

<220>

```

<223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (1)..(4)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (8)..(14)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 8-14

<220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (32)..(35)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 32-35

<400> 25

20 caggcaacgt ttcgttgagc atcaccatga tctcg 35

<210> 26  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero sintético

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(4)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(13)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 8-13

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (31)..(34)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 31-34

45 <400> 26

caggcaacgt tcgttgagca tcaccatgat cctg 34

<210> 27  
 50 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 55 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(4)  
 60 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(15)  
 65 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 8-15

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(36)  
 5 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 33-36  
  
 <400> 27  
  
 caggcaacgt ttogttgag atcaccatg atcctg 36  
 10  
 <210> 28  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(4)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4  
  
 <220>  
 25 <221> misc\_feature  
 <222> (32)..(35)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 32-35  
  
 <400> 28  
 30  
 caggctacgt ttogtagagc atcaccatga tctcg 35  
  
 <210> 29  
 <211> 35  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-3  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(35)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 33-35  
 50  
 <400> 29  
  
 caggctacgt ttogtagagc atcaccatga tctcg 35  
  
 55 <210> 30  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 60 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature

<222> (1)..(4)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4  
  
 <220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(36)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 33-36  
  
 <400> 30  
 10     caggogtctg ttctgaagag catcaccatg atcctg     36  
  
 <210> 31  
 <211> 36  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(4)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(36)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 33-36  
 30  
 <400> 31  
  
 caggogtctg ctctgaagag catcaccatg atcctg     36  
 35  
 <210> 32  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <222> (1)..(4)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> (33)..(36)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 33-36  
  
 <400> 32  
 55     caggctctg ctctgaagag catcaccatg atcctg     36  
  
 <210> 33  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 60 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 65 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(4)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4  
 5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(36)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 33-36  
 10 <400> 33  
 caggctacgt cgctgtagag catcaccatg atcctg 36  
 <210> 34  
 15 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Aptámero sintético  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(4)  
 25 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(14)  
 30 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 8-14  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (32)..(35)  
 35 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 32-35  
 <400> 34  
 caggcaagct ttgcttgagc atcaccatga tctctg 35  
 40 <210> 35  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 <220>  
 50 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(4)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 1-4  
 <220>  
 55 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(15)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 8-15  
 <220>  
 60 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(36)  
 <223> esqueleto de fosforotioato entre los nucleótidos 33-36  
 <400> 35  
 65

caggcaagct ttgcttgag catcaccatg atcctg 36

- <210> 36
- <211> 9
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Aptámero sintético
- 10 <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (9)..(9)
- <223> gm
- 15 <400> 36

caggctaog 9

- 20 <210> 37
- <211> 12
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 25 <220>
- <223> Aptámero sintético
- <220>
- <221> base\_modificada
- 30 <222> (5)..(5)
- <223> gm
- <220>
- <221> base\_modificada
- 35 <222> (7)..(7)
- <223> gm
- <220>
- <221> base\_modificada
- 40 <222> (12)..(12)
- <223> Adenosina es 2'-O-metilo
- <400> 37

ogtagagcat ca 12

- 45 <210> 38
- <211> 8
- <212> ADN
- 50 <213> Artificial
- <220>
- <223> Aptámero sintético
- 55 <220>
- <221> base\_modificada
- <222> (8)..(8)
- <223> gm
- 60 <400> 38

tgatcctg 8

- <210> 39

<211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> (6) .. (6)  
 <223> um

<220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> (8)..(8)  
 <223> cm

<220>  
 <221> base\_modificada  
 20 <222> (9)..(9)  
 <223> gm

<400> 39

25 caggcuacg 9

<210> 40  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero sintético

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> gm

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> gm

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (10)..(10)  
 <223> um

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (11)..(11)  
 <223> cm

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (12) .. (12)  
 <223> Adenosina es 2'-O-metilo

60 <400> 40

cgtagagcau ca 12

65 <210> 41  
 <211> 8

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (5) .. (6)  
 10 <223> cm  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (7) .. (7)  
 15 <223> um  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (8) .. (8)  
 20 <223> gm  
  
 <400> 41  
  
 tgatccug 8  
 25  
 <210> 42  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
  
 <400> 42  
 35 caggctaog 9  
  
 <210> 43  
 <211> 12  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 45  
 <400> 43  
  
 ogtagagcat ca 12  
 50  
 <210> 44  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 55  
 <400> 44  
  
 tgatcctg 8  
 60  
 <210> 45  
 <211> 9  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> Todas las purinas (A y G) y todas las pirimidinas (C y U) son 2'-O-metilo  
 10  
 <400> 45  
 caggcuaag 9  
 15  
 <210> 46  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 25  
 <222> (1) .. (12)  
 <223> Todas las purinas (A y G) y todas las pirimidinas (C y U) son 2'-O-metilo  
 <400> 46  
 30  
 cguagagcau ca 12  
 <210> 47  
 <211> 8  
 <212> ARN  
 35  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(8)  
 <223> Todas las purinas (A y G) y todas las pirimidinas (C y U) son 2'-O-metilo  
 45  
 <400> 47  
 ugauccug 8  
 50  
 <210> 48  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 55  
 <223> Aptámero sintético  
 <400> 48  
 acaggctaag 10  
 60  
 <210> 49  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero sintético  
 5 <400> 49  
 tgatcctgt 9  
 <210> 50  
 10 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Aptámero sintético  
 <400> 50  
 cacaggctac g 11  
 20 <210> 51  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 <400> 51  
 30 tgatcctgtg 10  
 <210> 52  
 <211> 9  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> cm  
 45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Adenosina es 2'-O-metilo  
 50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (3)..(4)  
 <223> gm  
 55 <400> 52  
 caggctacg 9  
 60 <210> 53  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

- <220>  
<223> Aptámero sintético
- 5 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (5)..(6)  
<223> cm
- 10 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (7)..(7)  
<223> um
- 15 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (8)..(8)  
<223> gm
- 20 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (9)..(9)  
<223> um
- 25 <400> 53  
tgatccugu 9
- 30 <210> 54  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 35 <220>  
<223> Aptámero sintético
- 40 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (5)..(6)  
<223> cm
- 45 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (7)..(7)  
<223> um
- 50 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (8)..(8)  
<223> gm
- 55 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (9)..(9)  
<223> um
- 60 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (10)..(10)  
<223> gm
- <400> 54  
tgatccugug 10
- 65 <210> 55

<211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> (8)..(8)  
 <223> cm  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> (9)..(9)  
 <223> gm  
  
 <400> 55  
 20 caggctaacg 9  
  
 <210> 56  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (6)..(6)  
 <223> um  
 35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (9)..(9)  
 <223> gm  
 40 <400> 56  
  
 caggcuaag 9  
  
 <210> 57  
 45 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (5)..(5)  
 55 <223> gm  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (7) .. (7)  
 60 <223> gm  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (11)..(11)  
 65 <223> cm

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (12)..(12)  
 5 <223> 2'-O-metil-adenosina  
  
 <400> 57  
  
 cgtagagcat ca 12  
 10  
 <210> 58  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> gm  
  
 <220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> gm  
  
 <220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> (10)..(10)  
 <223> um  
  
 <220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> (12)..(12)  
 <223> 2'-O-metil-adenosina  
  
 <400> 58  
 40  
 cgtagagcau ca 12  
  
 <210> 59  
 <211> 9  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (5)..(5)  
 <223> cm  
 55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> um  
 60  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> cm  
 65

<400> 59

caggcuacg 9

5 <210> 60  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> (1) .. (1)  
 <223> cm

<220>  
 <221> base\_modificada  
 20 <222> (3)..(3)  
 <223> um

<220>  
 <221> base\_modificada  
 25 <222> (8)..(8)  
 <223> cm

<220>  
 <221> base\_modificada  
 30 <222> (10)..(10)  
 <223> um

<220>  
 <221> base\_modificada  
 35 <222> (11)..(11)  
 <223> cm

<400> 60

40 uguagagcau ca 12

<210> 61  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero sintético

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> um

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (4)..(4)  
 <223> um

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (5) .. (6)  
 <223> cm

65 <220>

<221> base\_modificada  
 <222> (7)..(7)  
 <223> um

5 <400> 61

    ugauccug    8

<210> 62  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> Aptámero sintético

15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> cm

20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (7)..(7) <223> um

25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> gm

30

<400> 62

    tgatccug    8

35

<210> 63  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40

<220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (11)..(11)  
 <223> gm

45

<400> 63

    cacaggtac g    11

50

<210> 64  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

55

<220>  
 <223> Aptámero sintético

60

<400> 64

    tgatctgtg    10

<210> 65

<211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> (6)..(6)  
 <223> cm

<220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> (7)..(7)  
 <223> um

<220>  
 <221> base\_modificada  
 20 <222> (8)..(8)  
 <223> gm

<220>  
 <221> base\_modificada  
 25 <222> (9)..(9)  
 <223> um

<220>  
 <221> base\_modificada  
 30 <222> (10)..(10)  
 <223> gm

<400> 65

35 `tgatccugug` 10

<210> 65  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 40 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero sintético

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (8)..(8)  
 <223> um

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (10)..(10)  
 <223> cm

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (11)..(11)  
 <223> gm

60 <400> 66

`cacagguac g` 11

65 <210> 67  
 <211> 8

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (5)..(5)  
 10 <223> cm  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (7)..(7)  
 15 <223> um  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (8)..(8)  
 20 <223> gm  
  
 <400> 67  
  
 tgatccug 8  
 25  
 <210> 68  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> (5)..(6)  
 <223> cm  
  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> (8)..(8)  
 <223> gm  
  
 <400> 68  
 45  
 tgatcdg 8  
  
 <210> 69  
 <211> 11  
 50 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (11)..(11)  
 <223> gm  
 60  
 <400> 69  
  
 cccaggctac g 11  
 65 <210> 70

<211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> (5)..(5)  
 <223> cm  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> (8)..(10)  
 <223> gm  
  
 <400> 70  
 20 `tgatcctggg` 10  
  
 <210> 71  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (8)..(10)  
 <223> gm  
 35 <400> 71  
  
`tgatcctggg` 10  
  
 <210> 72  
 40 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Aptámero sintético  
  
 <400> 72  
  
`tgatcctggg` 10  
 50 <210> 73  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> (5)..(5)  
 <223> cm  
  
 <400> 73  
 65

tgatcctggg 10  
 <210> 74  
 <211> 88  
 5 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> molde sintético  
 10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(88)  
 <223> Todas las pirimidinas (C y U) son 2'-flúor  
 15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25) .. (64)  
 <223> n e s a , g , c o u  
 20 <400> 74  
 gggaaaagcg aaucauacac aagannnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60  
 nnnngcuccg ccagagacca accgagaa 88  
 25 <210> 75  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador sintético  
 <400> 75  
 35 taatacgact cactataggg aaaagcgaat catacacaag a 41  
 <210> 76  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 40 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador sintético  
 45 <400> 76  
 ttctcgggtg gtctctggcg gagc 24  
 50 <210> 77  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 55 <223> Aptámero sintético  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1) .. (87)  
 60 <223> Todas las pirimidinas (C y U) son 2'-flúor  
 <400> 77

ES 2 373 047 T3

|    |                                                                                                       |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | gggaaaagcg aauc <u>au</u> acac aagau <u>c</u> cca ggagcaaagu cacggaggag uggggguacg                    | 60 |
|    | aaugcuccg cagagaccaa ccgagaa                                                                          | 87 |
| 5  | <210> 78<br><211> 88<br><212> ARN<br><213> Artificial                                                 |    |
| 10 | <220><br><223> Aptámero sintético                                                                     |    |
| 15 | <220><br><221> base_modificada<br><222> (1)..(88)<br><223> Todas las pirimidinas (C y U) son 2'-flúor |    |
|    | <400> 78                                                                                              |    |
|    | gggaaaagcg aauc <u>au</u> acac aagaccggga acucggauuc uucgcaugug gaugcgauca                            | 60 |
|    | guaugcuccg ccagagacca accgagaa                                                                        | 88 |
| 20 | <210> 79<br><211> 88<br><212> ARN<br><213> Artificial                                                 |    |
| 25 | <220><br><223> Aptámero sintético                                                                     |    |
| 30 | <220><br><221> base_modificada<br><222> (1)..(88)<br><223> Todas las pirimidinas (C y U) son 2'-flúor |    |
| 35 | <400> 79                                                                                              |    |
|    | gggaaaagcg aauc <u>au</u> acac aagaccggga acucggauuc uucacaugug gaugugauca                            | 60 |
|    | guaugcuccg ccagagacca accgagaa                                                                        | 88 |
| 40 | <210> 80<br><211> 88<br><212> ARN<br><213> Artificial                                                 |    |
| 45 | <220><br><223> Aptámero sintético                                                                     |    |
| 50 | <220><br><221> base_modificada<br><222> (1)..(88)<br><223> Todas las pirimidinas (C y U) son 2'-flúor |    |
|    | <400> 80                                                                                              |    |
|    | gggaaaagcg aauc <u>au</u> acac aagaccggaa acucggauuc uucgcaugug gaugcgauca                            | 60 |
|    | guaugcuccg ccagagacca accgagaa                                                                        | 88 |
| 55 | <210> 81                                                                                              |    |

ES 2 373 047 T3

<211> 88  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> (1) .. (88)  
 <223> Todas las pirimidinas (C y U) son 2'-flúor

<400> 81

gggaaaagcg aaucauacac aagagagugg aggagguaug uaugguuugu ggcucuggug 60  
 15 cggugcuccg ccagagacca accgagaa 88

<210> 82  
 <211> 93  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial

<220>  
 <223> molde sintético

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(93)  
 <223> Todas las purinas (A y G) y todas las pirimidinas (C y T) pueden ser 2'-O-metilo

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25)..(54)  
 <223> n es a, g, c o t

35 <400> 82

catcgatgct agtcgtaacg atccnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnncgagaa 60  
 cgttctctcc tctccctata gtgagtcgta tta 93

<210> 83  
 <211> 92  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 45 <223> molde sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(92)  
 50 <223> Todas las purinas (A y G) y todas las pirimidinas (C y T) pueden ser 2'-O-metilo

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (24) .. (53)  
 55 <223> n es a, g, c, o t

<400> 83

ES 2 373 047 T3

catgcatcgc gactgactag ccgnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngtagaac 60  
gttctctcct ctcctatag tgagtcgtat ta 92

<210> 84  
<211> 92  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> molde sintético

10 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (1)..(92)  
<223> Todas las pirimidinas (C y T) pueden ser 2'-O-metilo

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (24) .. (53)  
<223> n es a, g, c o t

20 <400> 84

catcgatcga tcgatcgaca gcgnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngtagaac 60  
gttctctcct ctcctatag tgagtcgtat ta 92

25 <210> 85  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> sintético

<400> 85

35 aacgttcgag 10

<210> 86  
<211> 26  
<212> ADN  
40 <213> Artificial

<220>  
<223> Aptámero sintético

45 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (11)..(14)  
<223> 2'-O-metilo

50 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (19) .. (19)  
<223> 2'-O-metilo

55 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (21)..(21)  
<223> 2'-O-metilo

60 <220>

<221> base\_modificada  
 <222> (24)..(26)  
 <223> 2'-O-metilo  
 5 <400> 86  
 cccaggctac guuuuogtaga gcauca 26  
 <210> 87  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Aptámero sintético  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (5) .. (5)  
 20 <223> 2'-O-metilo  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (8)..(10)  
 25 <223> 2'-O-metilo  
 <400> 87  
 tgatcctggg 10  
 30 <210> 88  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> (11)..(15)  
 <223> 2'-O-metilo  
 <220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> (20)..(20)  
 <223> 2'-O-metilo  
 <220>  
 50 <221> base\_modificada  
 <222> (22) .. (22)  
 <223> 2'-O-metilo  
 <220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> (25)..(27)  
 <223> 2'-O-metilo  
 <400> 88  
 60 cccaggctac guuuuogtag agcauca 27  
 <210> 89  
 <211> 11

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (11) .. (11)  
 10 <223> 2'-O-metilo  
  
 <400> 89  
  
 cccaggctac g 11  
 15  
 <210> 90  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
  
 <400> 90  
 25  
 aacgft 6  
  
 <210> 91  
 <211> 25  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 2'-O-metilo  
 40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 2'-O-metilo  
 45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (10)..(15)  
 <223> 2'-O-metilo  
 50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (20) .. (20)  
 <223> 2'-O-metilo  
 55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (23)..(25)  
 <223> 2'-O-metilo  
 60  
 <400> 91  
  
 cgtagagcau cauuutgatc ctggg 25  
 65 <210> 92

<211> 4  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 <400> 92  
 10 acgt 4  
 <210> 93  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 2'-O-metilo  
 25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (7)..(7)  
 <223> 2'-O-metilo  
 30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (10)..(16)  
 <223> 2'-O-metilo  
 35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (21)..(21)  
 <223> 2'-O-metilo  
 40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (24)..(26)  
 <223> 2'-O-metilo  
 45 <400> 93  
 cgtagagcau cauuuutgat cctggg 26  
 <210> 94  
 50 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 55 <223> Aptámero sintético  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (11)..(14)  
 60 <223> 2'-O-metilo  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (19)..(19)  
 65 <223> 2'-O-metilo

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (21)..(21)  
 5 <223> 2'-O-metilo

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (24)..(29)  
 10 <223> 2'-O-metilo

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (34)..(34)  
 15 <223> 2'-O-metilo

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (37)..(39)  
 20 <223> 2'-O-metilo

<400> 94

cccaggctac guuuogtaga gcaucuuut gatcctggg 39

25

<210> 95  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30

<220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (11)..(15)  
 35 <223> 2'-O-metilo

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (20)..(20)  
 40 <223> 2'-O-metilo

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (22)..(22)  
 45 <223> 2'-O-metilo

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (25)..(31)  
 50 <223> 2'-O-metilo

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (36)..(36)  
 55 <223> 2'-O-metilo

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (39)..(41)  
 60 <223> 2'-O-metilo

<400> 95

65

cccaggctac guuuuogtag agcaucauuu utgatcctgg g 41

5 <210> 96  
 <211> 4  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 <400> 96

rcgy 4

15 <210> 97  
 <211> 4  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Aptámero sintético  
 <400> 97

25 gaaa 4

<210> 98  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero sintético  
 <400> 98

rrogyy 6

40 <210> 99  
 <211> 4  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> n es a, c, g o t

55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(4)

60 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(4)  
 <223> n es a, c, g o t

<400> 99  
 nogn 4

5 <210> 100  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Aptámero sintético

<220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (1)..(2)  
 <223> n es a, c, g o t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (5)..(6)  
 <223> n es a, c, g o t

<400> 100

25 nnognn 6

<210> 101  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero sintético

35 <400> 101

rdoght 6

40 <210> 102 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Aptámero sintético

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 2'-O-metilo

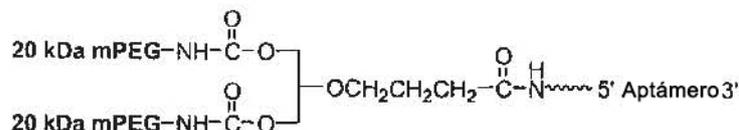
50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (8)..(10)  
 <223> 2'-O-metilo

55 <400> 102

tgatcctggg 10

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero específico para PDGF que comprende la siguiente estructura:



5

en la que

~~~~~ indica un ligador

10

Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG (SEC ID N°: 69) - PEG - dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N°: 40) - PEG - dTdTdAdTmCdCdTmGmGmG-3T-3' (SEC ID N°: 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, PEG denota un espaciador de PEG y 3T denota una tapa de desoxi-timidina invertida.

15

2. El aptámero de la reivindicación 1, en el que el ligador es un ligador de alquilo.

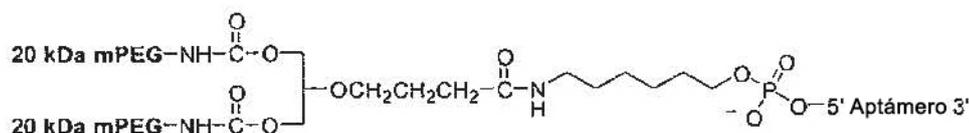
3. El aptámero de la reivindicación 2, en el que el ligador de alquilo comprende 2 a 18 grupos CH₂ consecutivos.

20

4. El aptámero de la reivindicación 2, en el que el ligador de alquilo comprende 2 a 12 grupos CH₂ consecutivos.

5. El aptámero de la reivindicación 2, en el que el ligador de alquilo comprende 3 a 6 grupos CH₂ consecutivos.

6. El aptámero de la reivindicación 5, en el que el aptámero comprende la siguiente estructura:



25

en la que Aptámero = 5'dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG (SEC ID N°: 69) - PEG - dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA (SEC ID N°: 40) - PEG - dTdTdAdTmCdCdTmGmGmG-3T-3' (SEC ID N°: 70); en la que d denota un desoxi-nucleótido, m denota un 2'-OMe-nucleótido, PEG denota un espaciador de PEG y 3T denota una tapa de desoxi-timidina invertida.

30

7. Un aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el espaciador es un espaciador de PEG 6.

35

8. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una sal del mismo.

9. La composición de la reivindicación 8, en la que la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable o diluyente.

40

10. Una composición según la reivindicación 9 para su uso en un procedimiento para tratar un tumor sólido, procedimiento que comprende administrar la composición a un sujeto que tiene el tumor sólido.

45

11. La composición para su uso según la reivindicación 10, comprendiendo el procedimiento de tratar un tumor sólido además administrar al sujeto un agente citotóxico.

12. Un aptámero específico para PDGF según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en un procedimiento para tratar un tumor mediado por PDGF en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar el aptámero específico para PDGF al sujeto y tratar el sujeto con radioterapia.

50

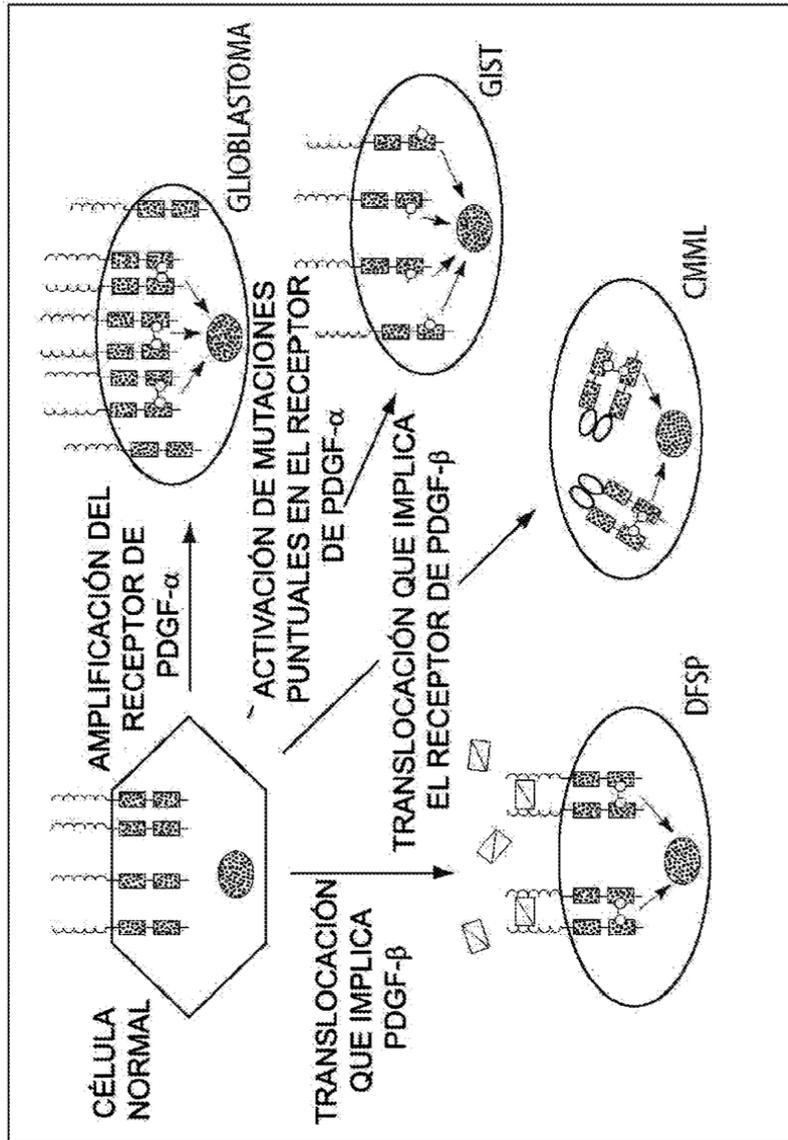


Figura 1

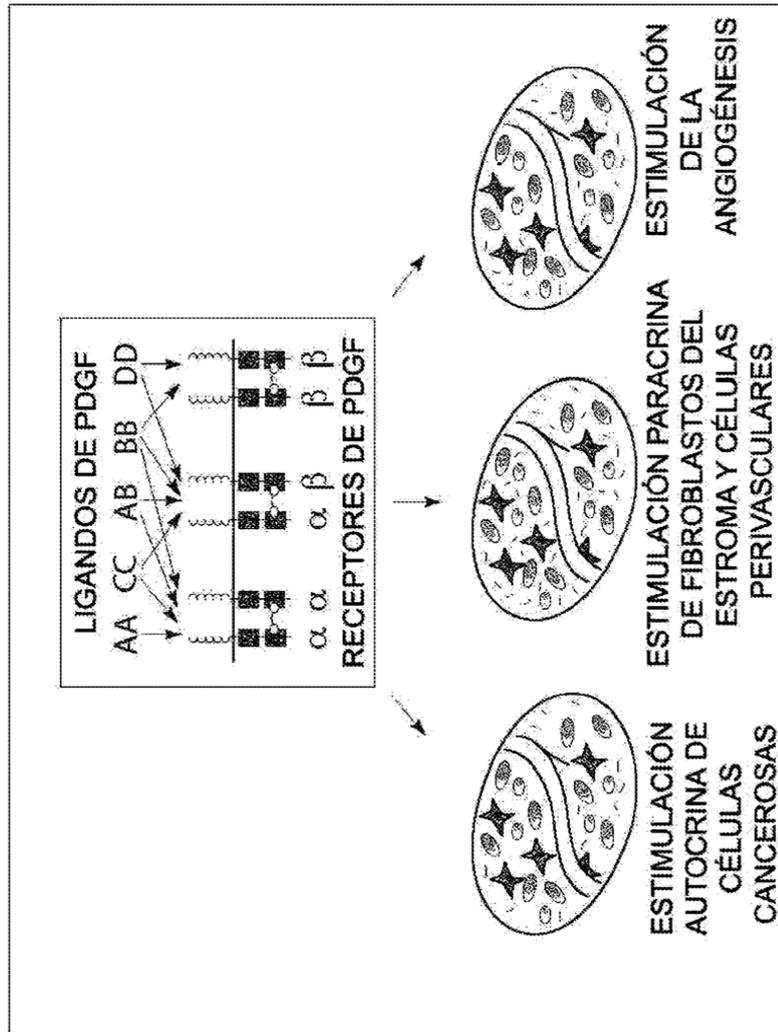


Figura 2

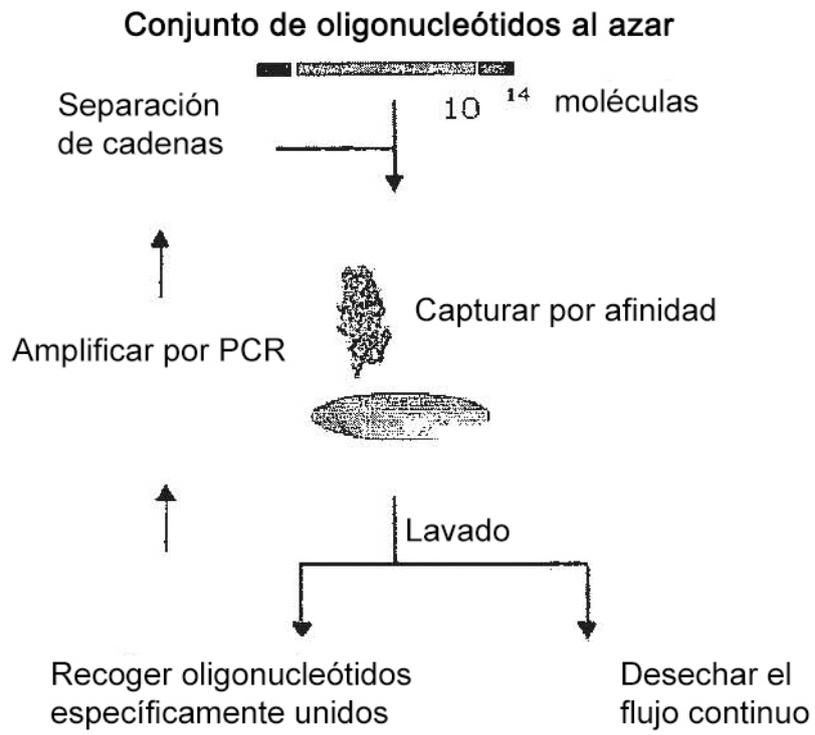


Figura 3

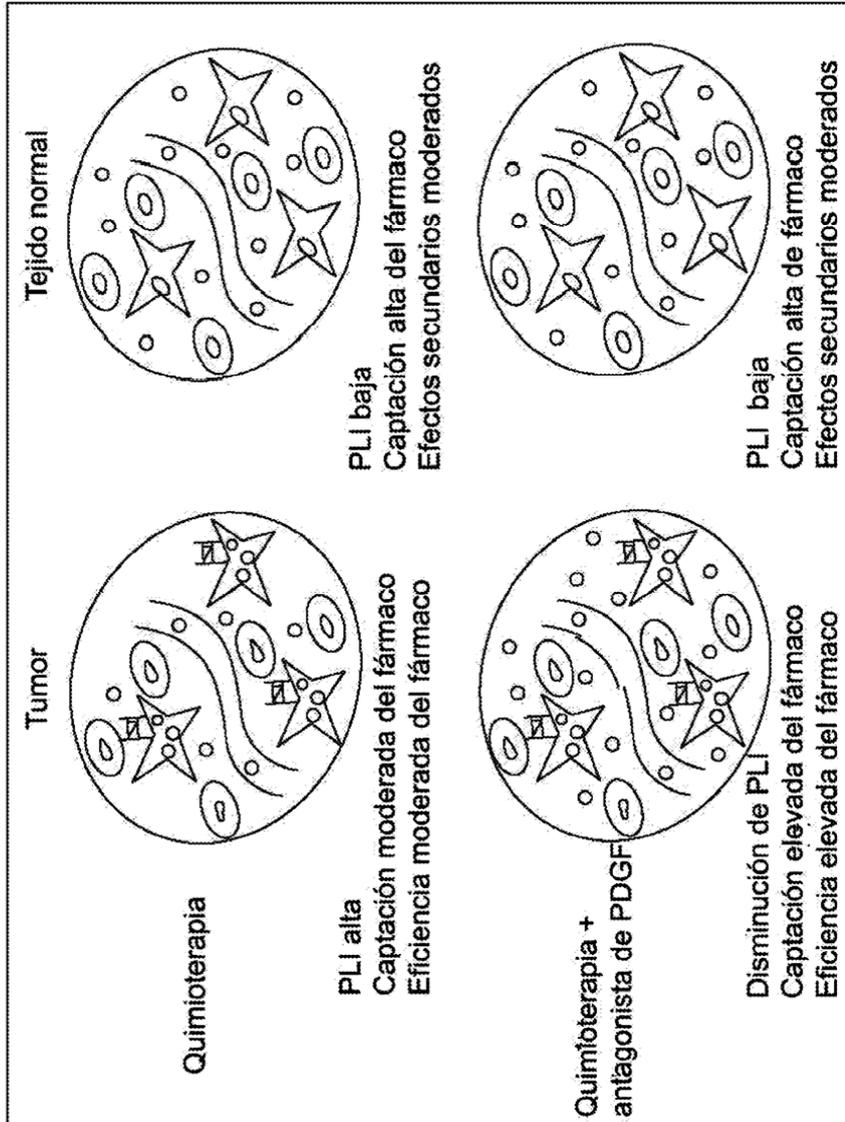


Figura 4

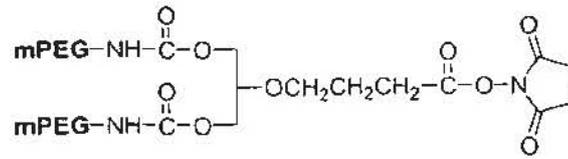


Figura 5

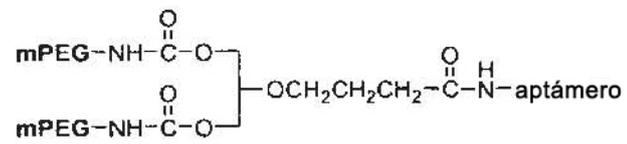
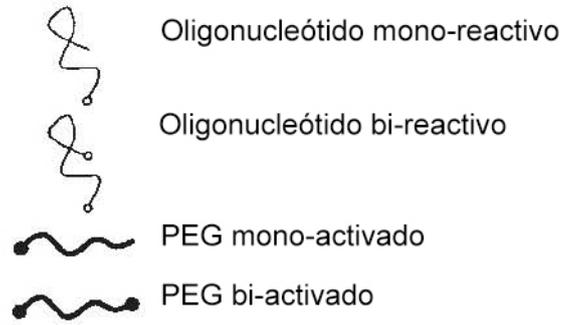
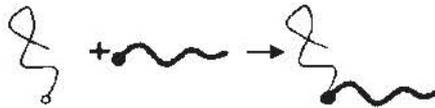


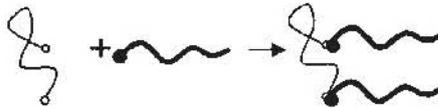
Figura 6



PEGilación convencional



PEGilación múltiple



Dimerización por PEGilación

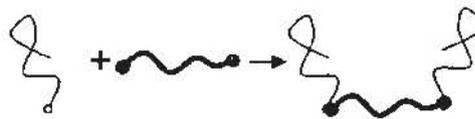


Figura 7

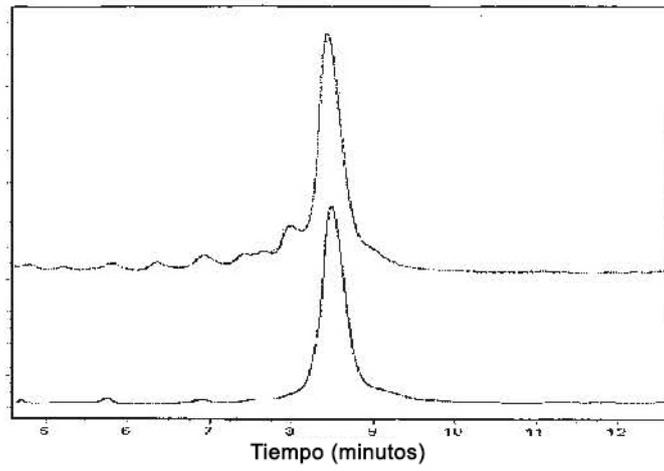


Figura 8A

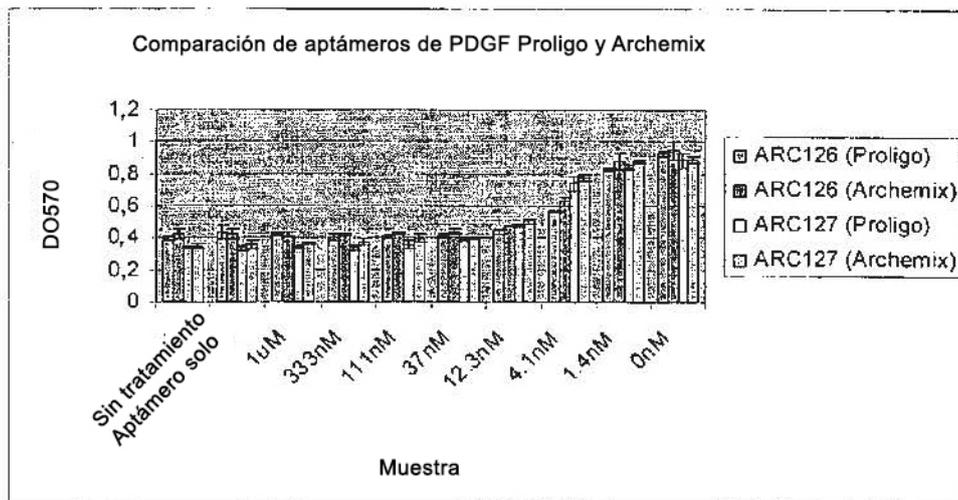


Figura 8B

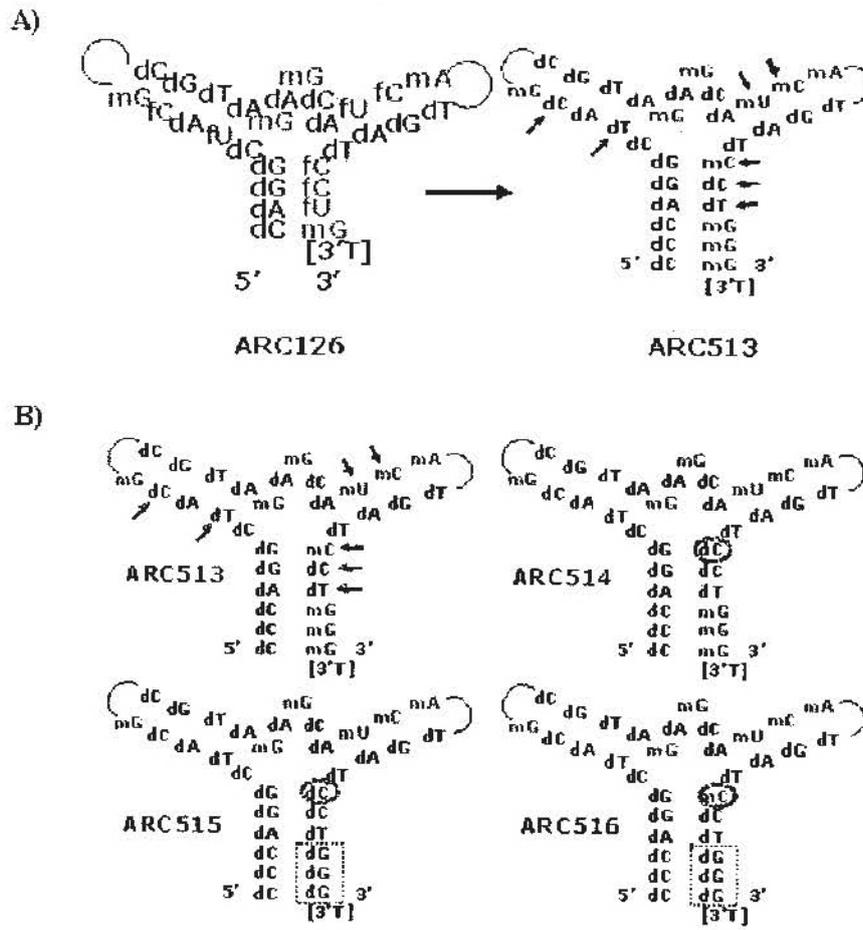
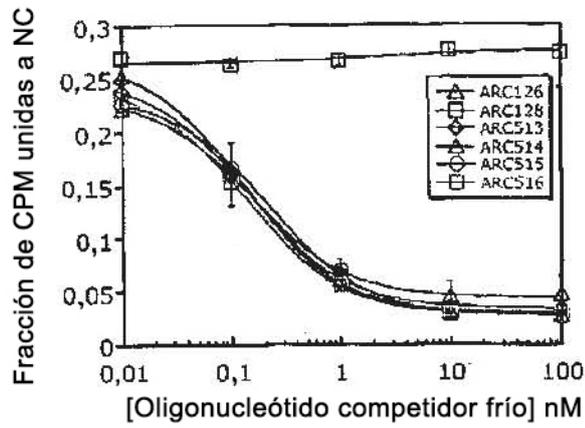


Figura 9

A)



B)

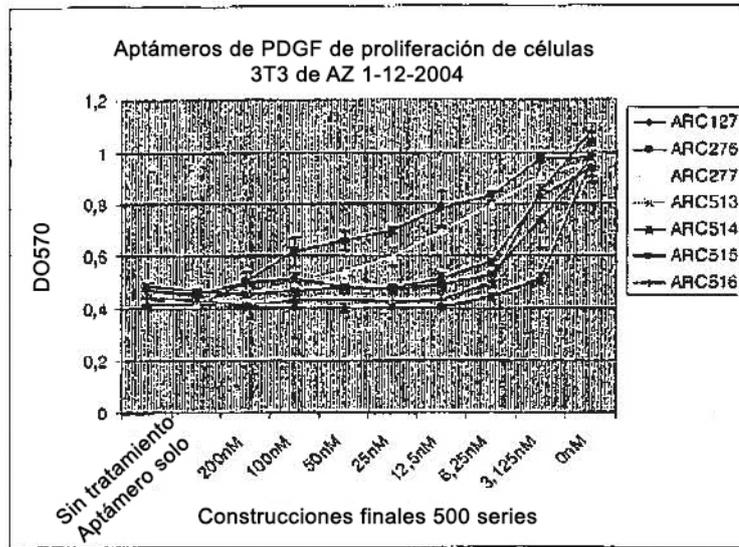
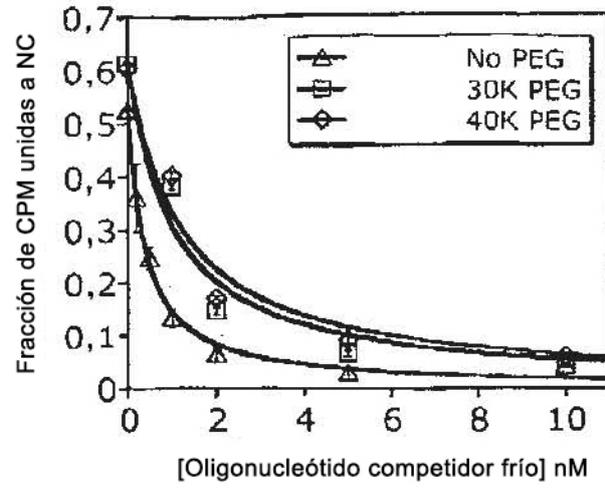


Figura 10

A)



B)

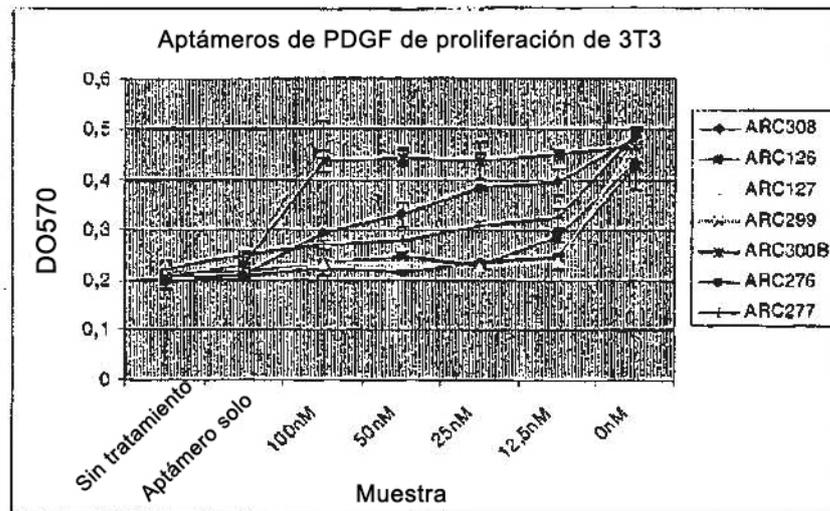


Figura 11

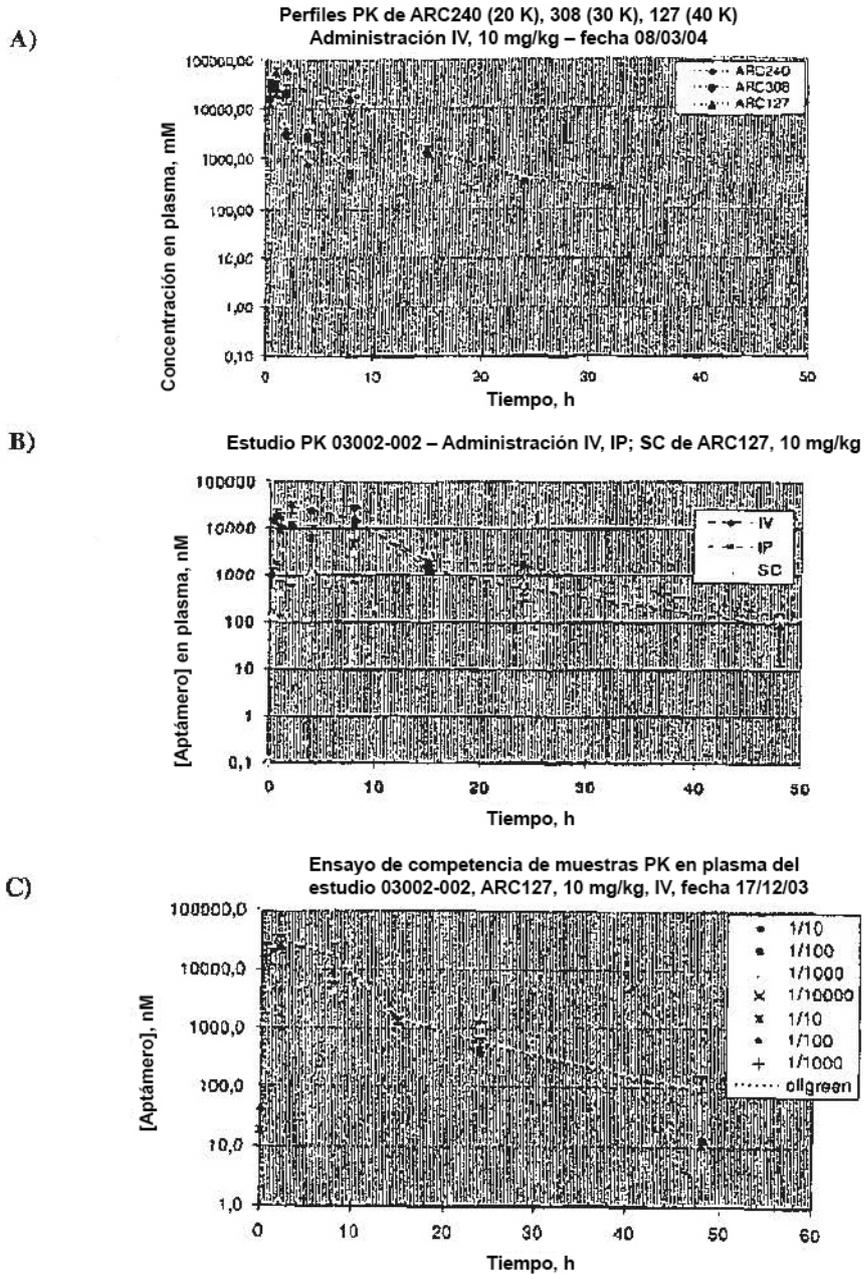
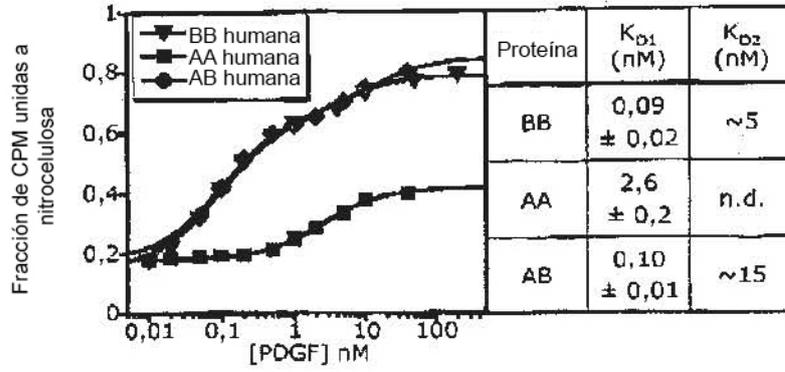


Figura 12

A)



B)

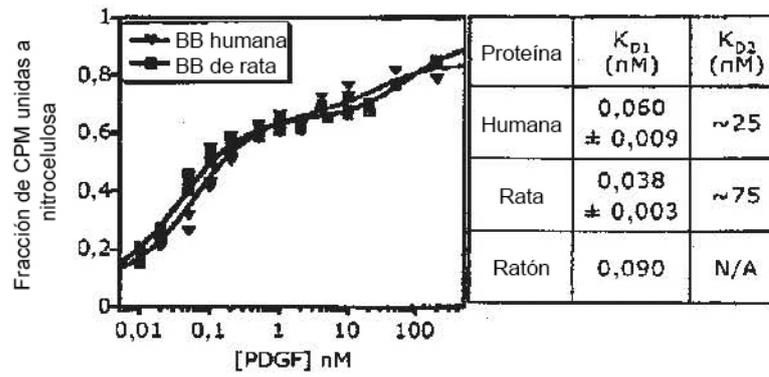
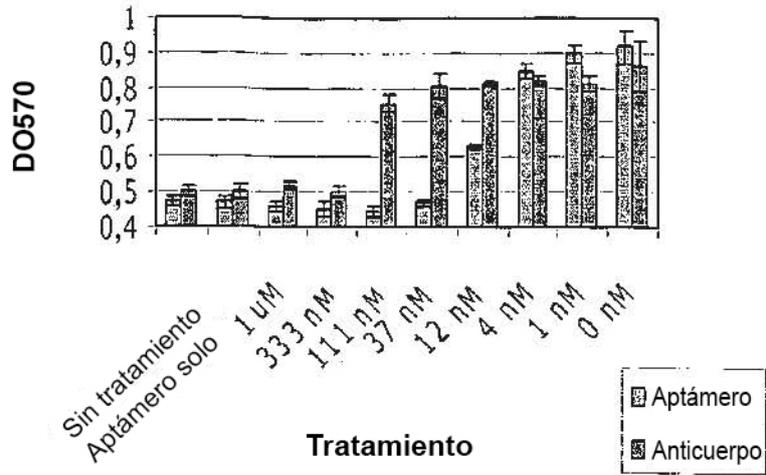


Figura 13

A)



B)

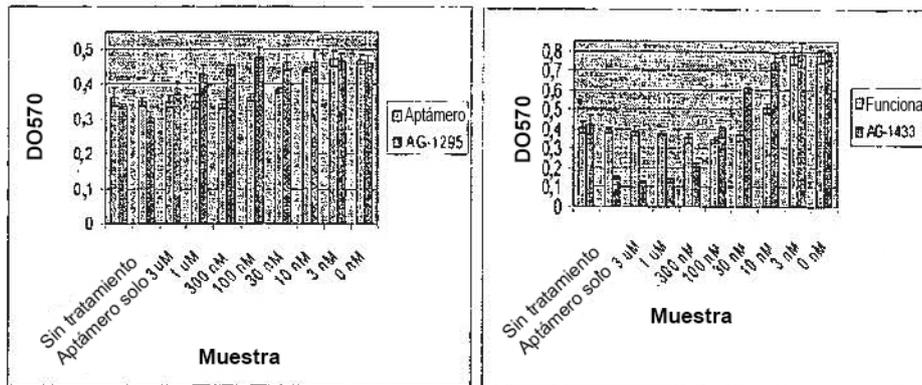


Figura 14

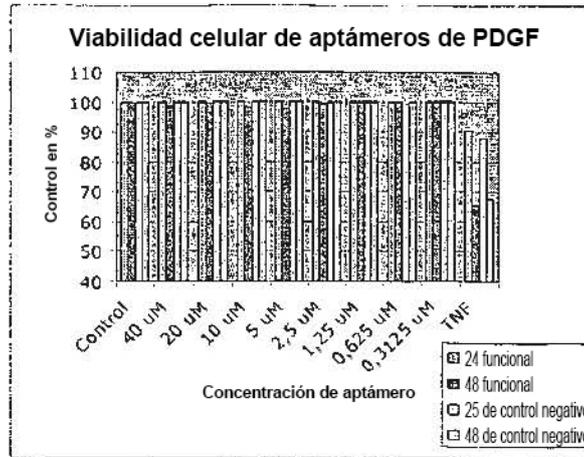


Figura 15

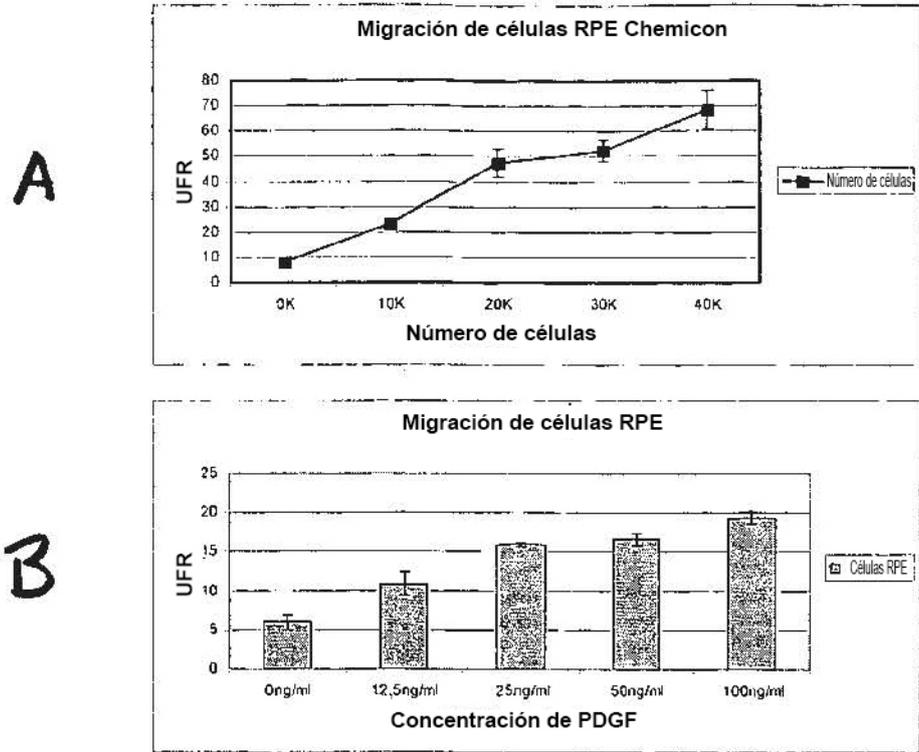


Figura 16

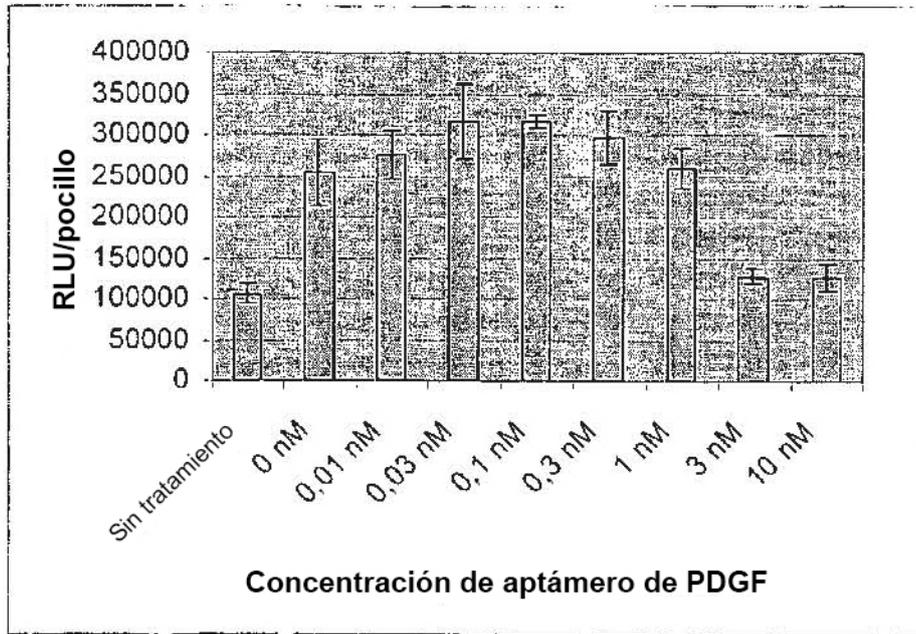


Figura 17

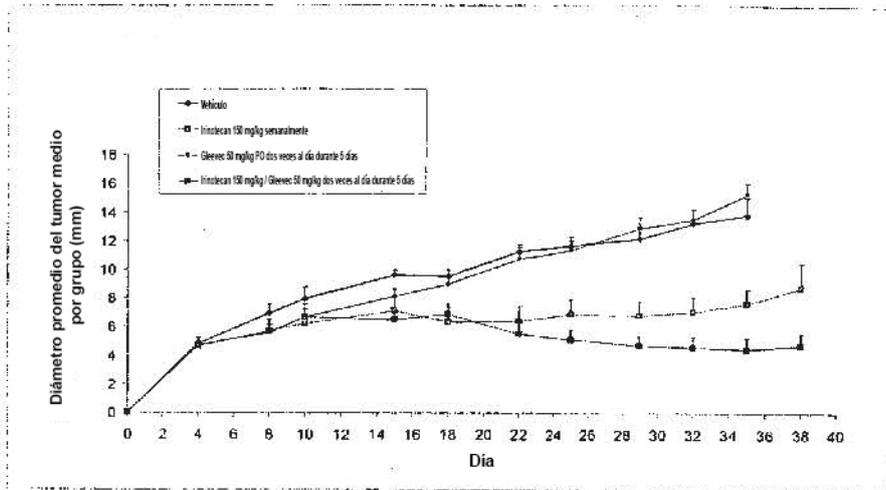


Figura 18A

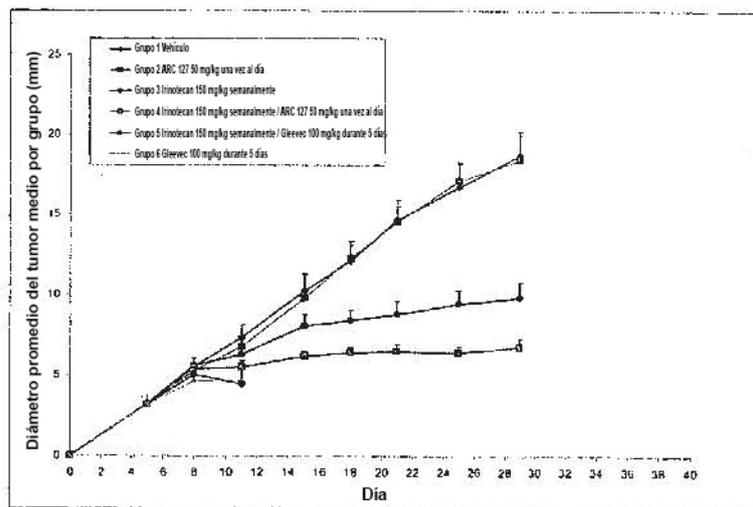


Figura 18B

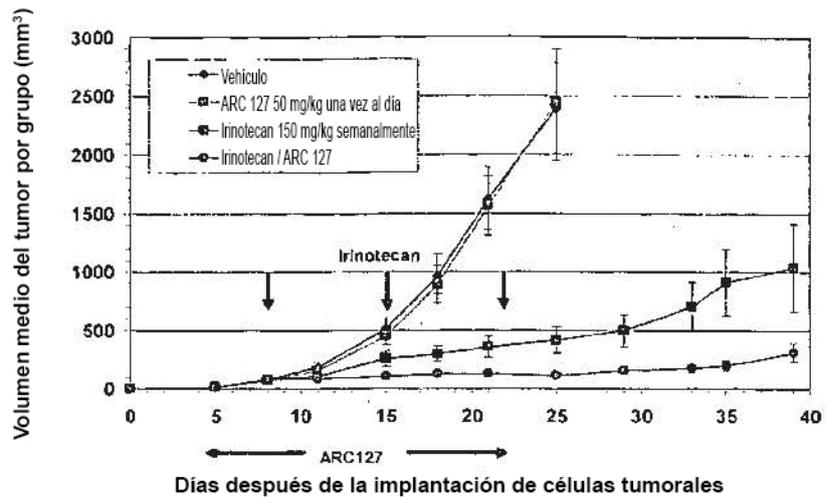


Figura 18C

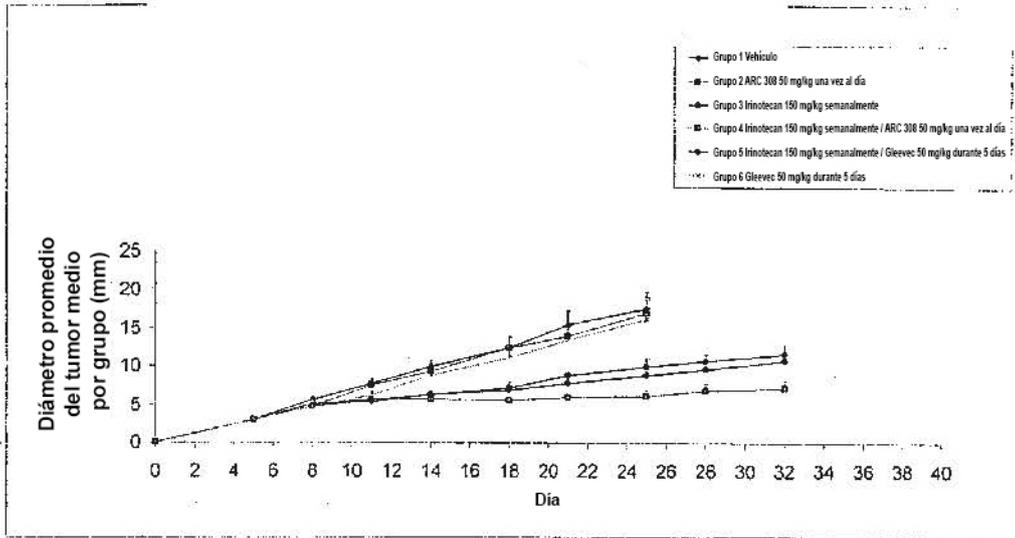


Figura 19A

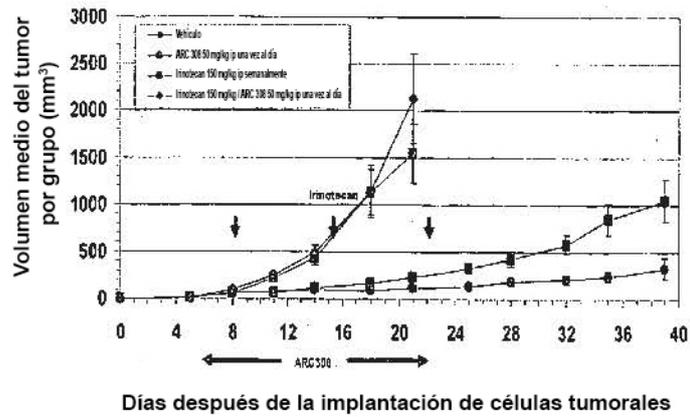
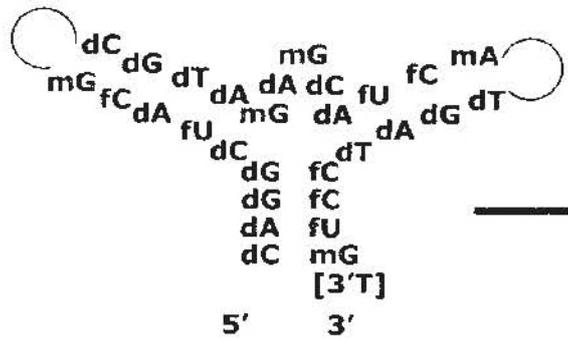


Figura 19B

mA mA
mG mG
mA mU
mG mC
mU
mU mU mG
mG mC
mA
mC mG
mG mC
mU mA
mA mU
idT

Figura 20A



ARC126

Figura 20B

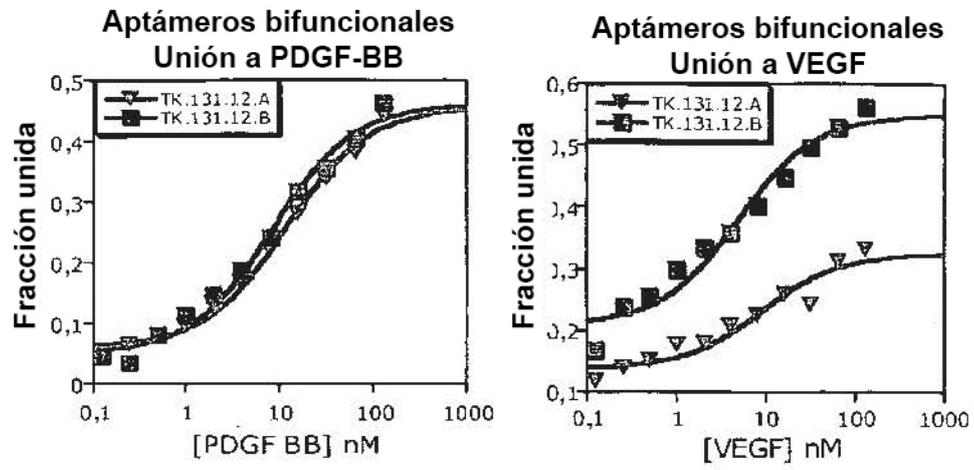


Figura 22

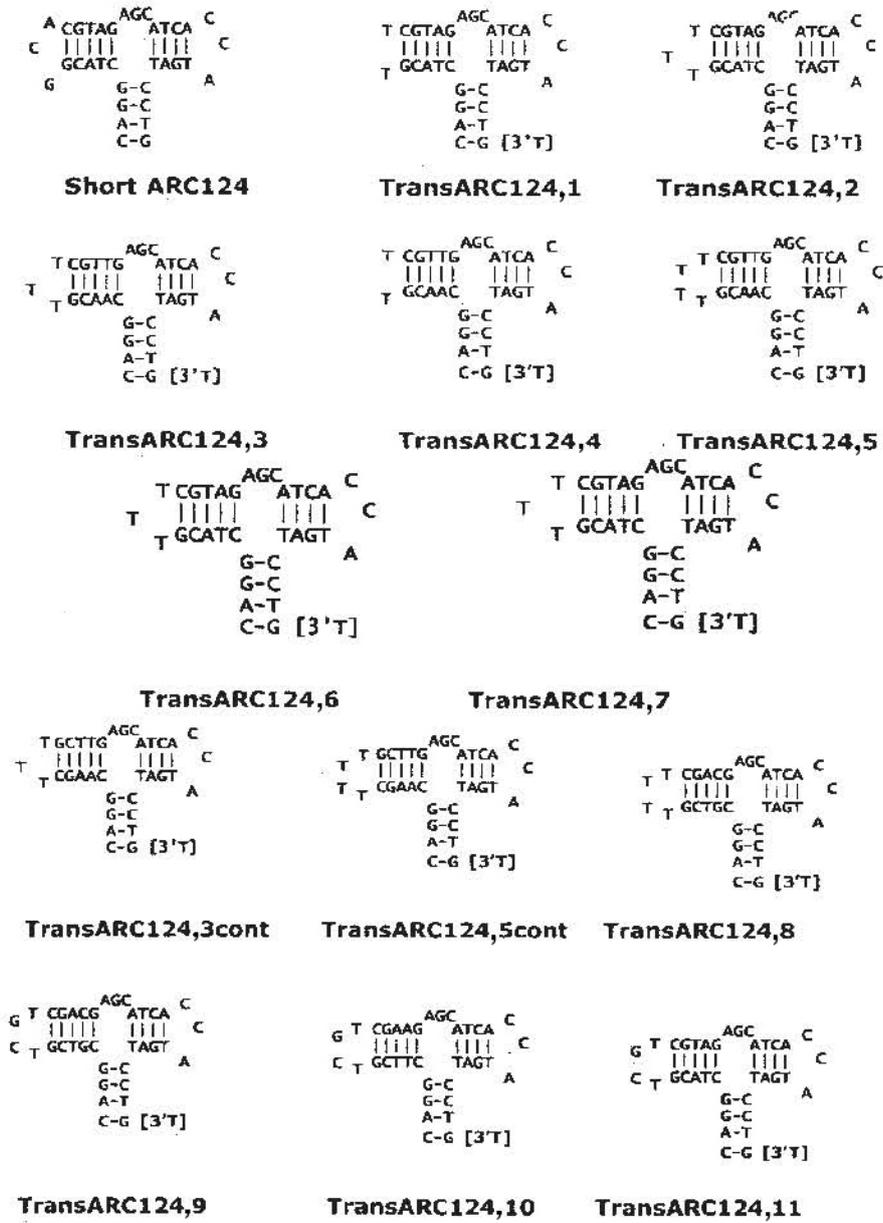


Figura 23

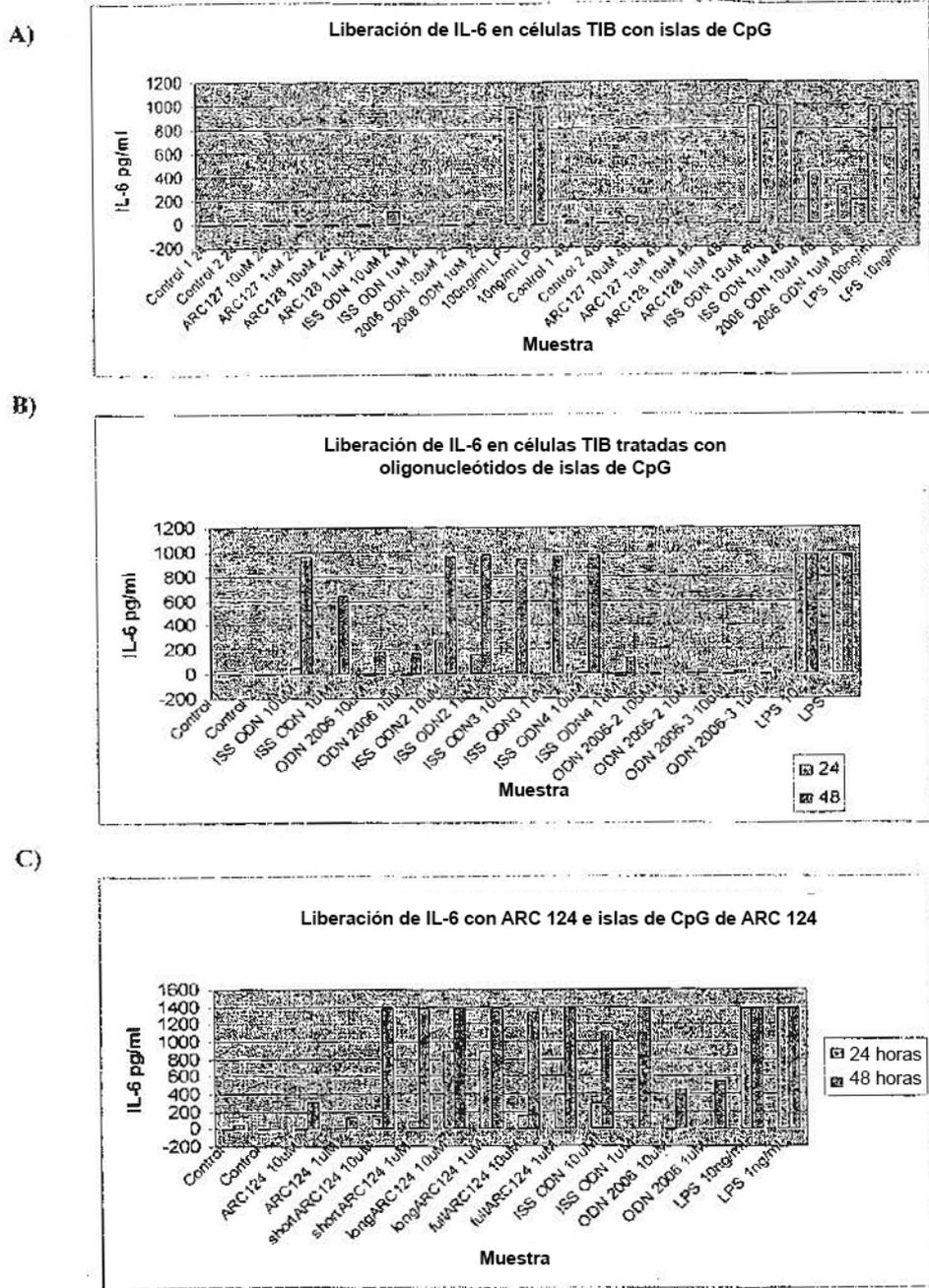
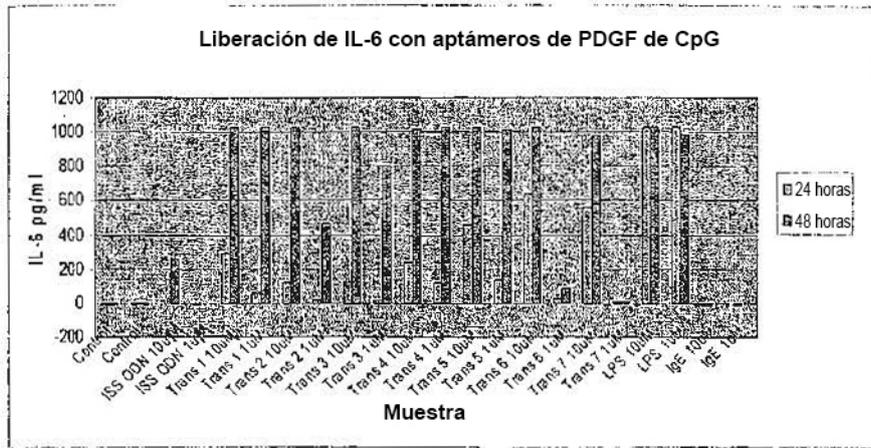


Figura 24

D)



E)

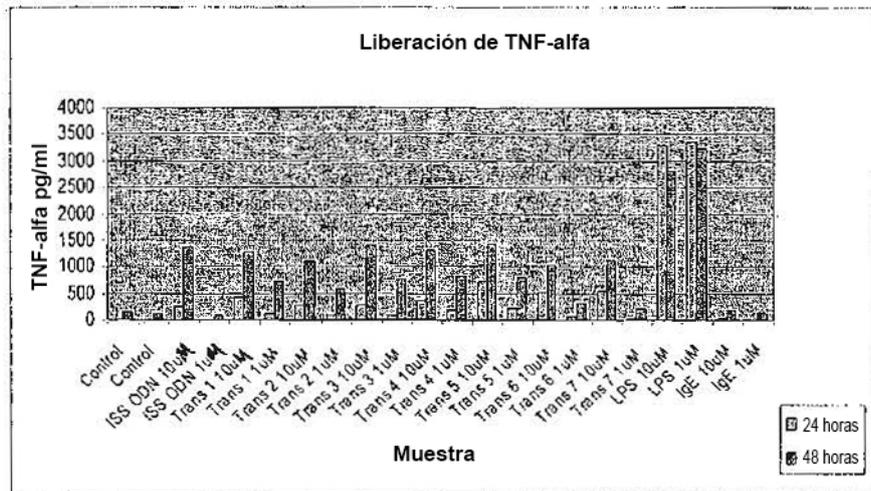


Figura 24 (continuación)

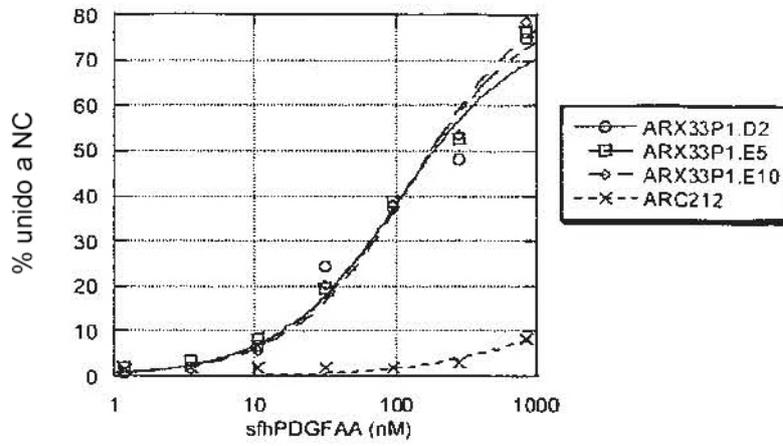


Figura 25A

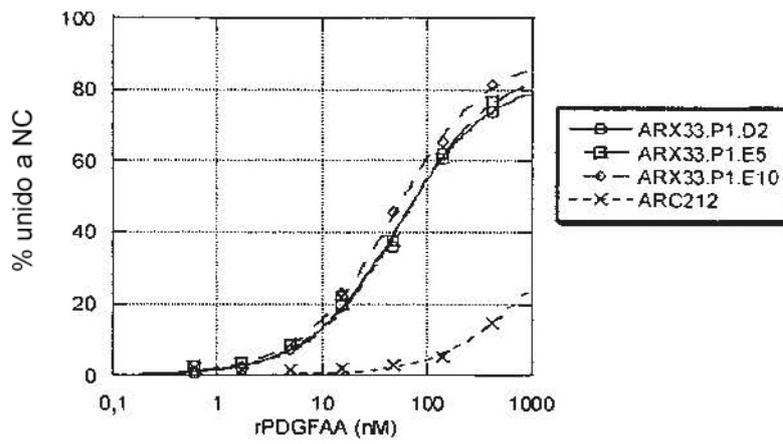


Figura 25B

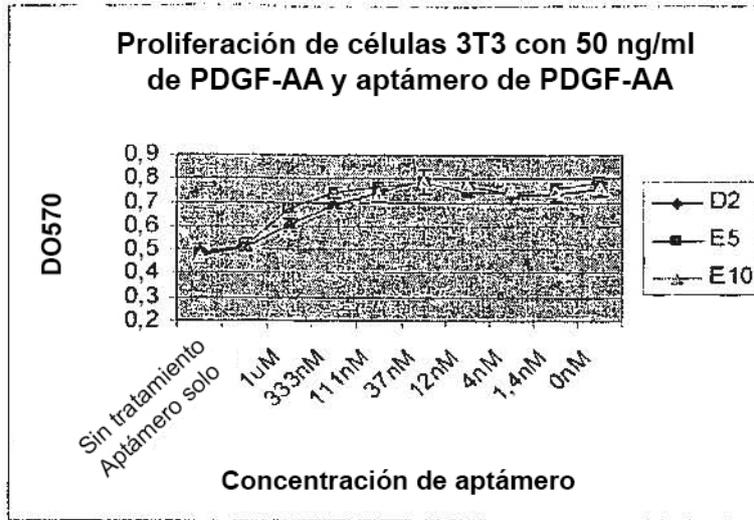


Figura 26

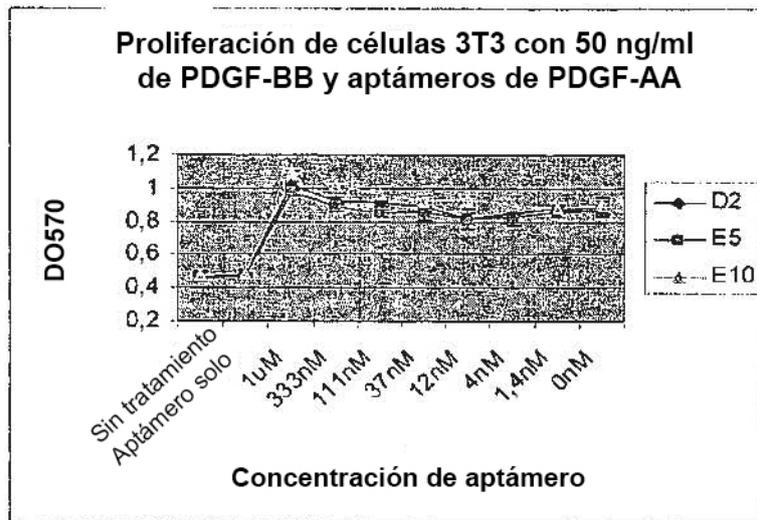


Figura 27

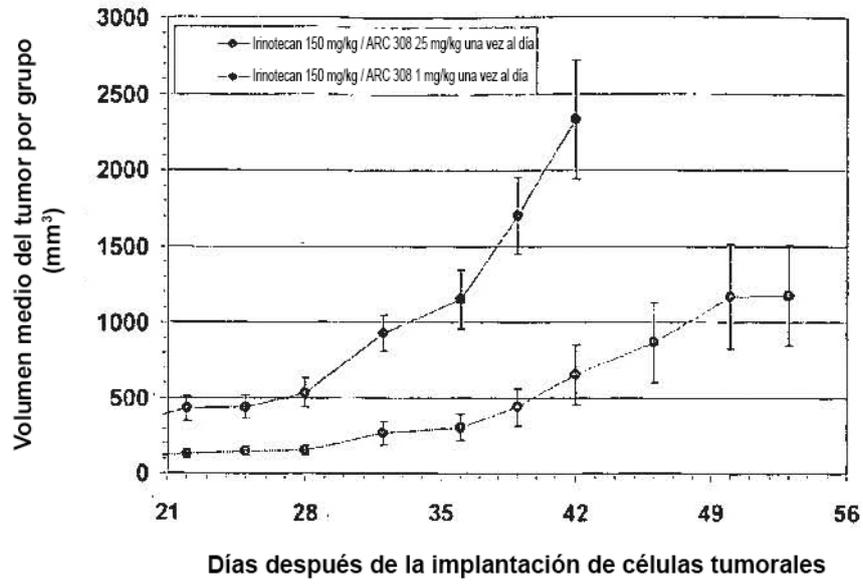


Figura 28

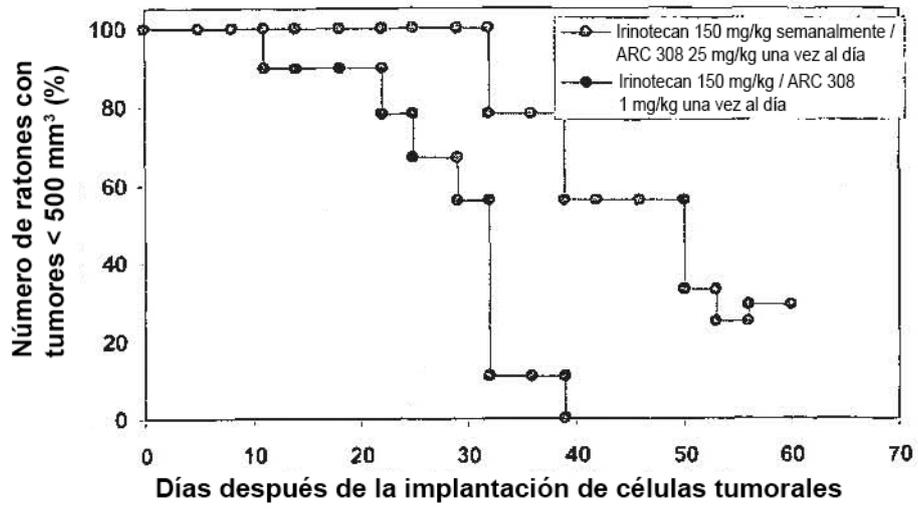


Figura 29

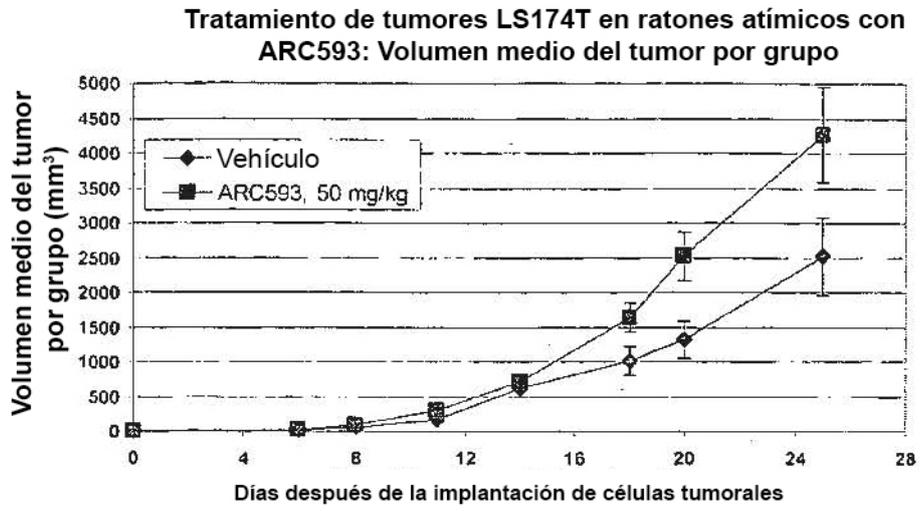


Figura 30

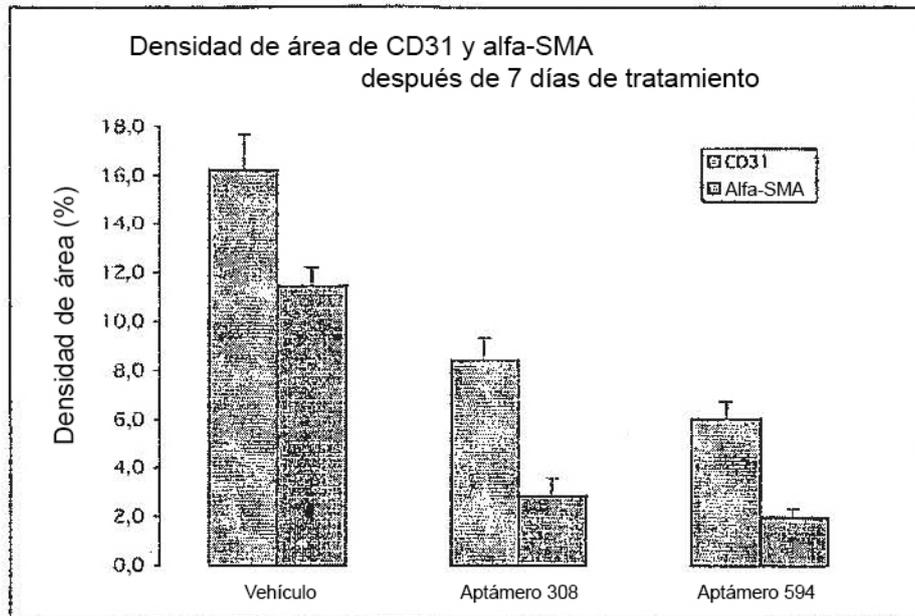


Figura 31

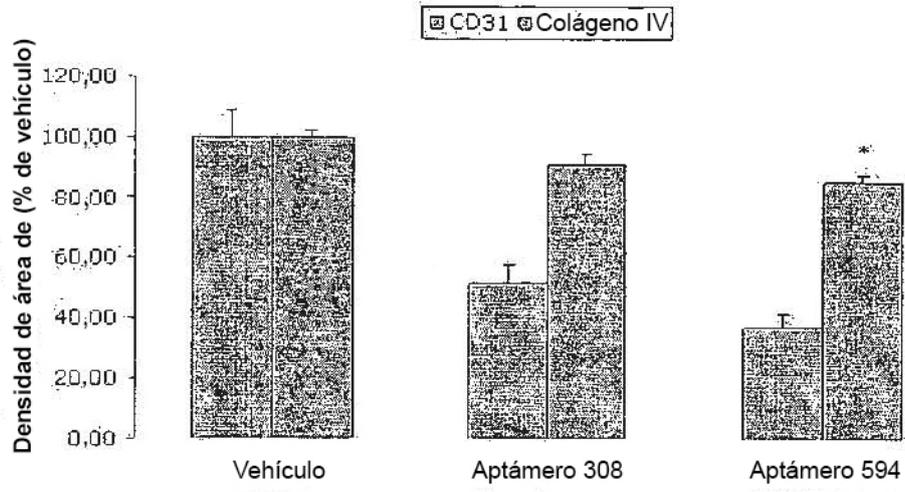


Figura 32

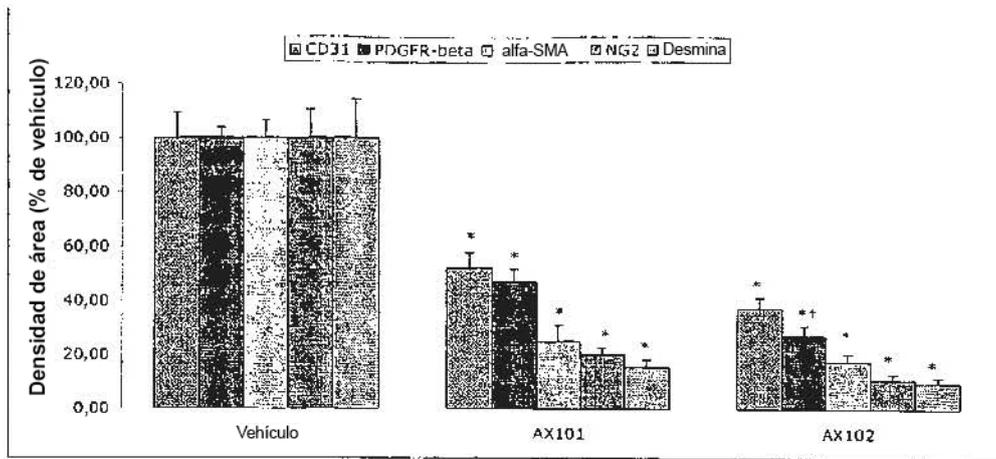


Figura 33

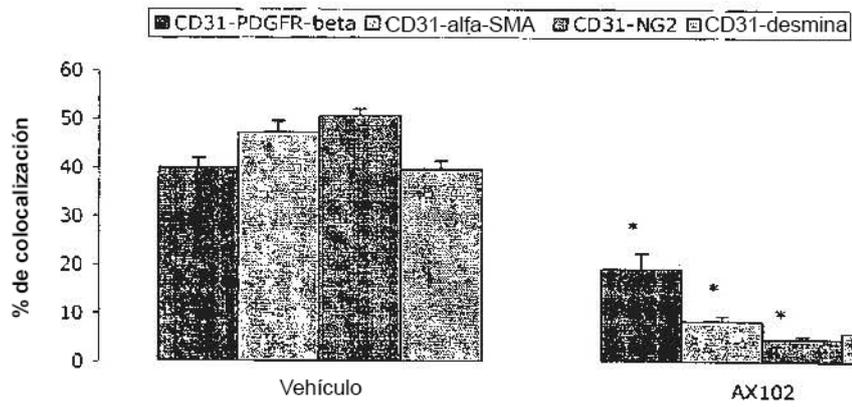


Figura 34

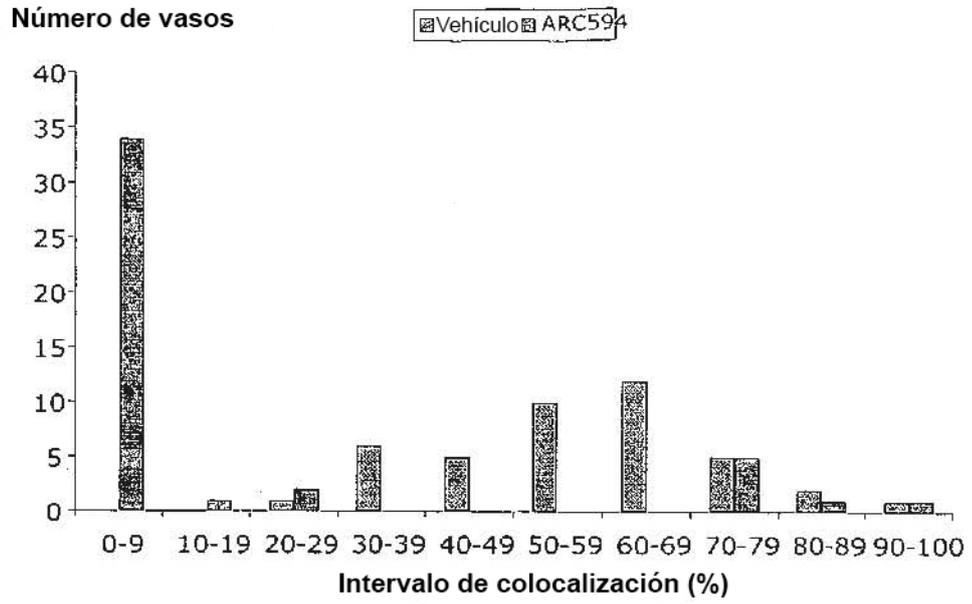


Figura 35

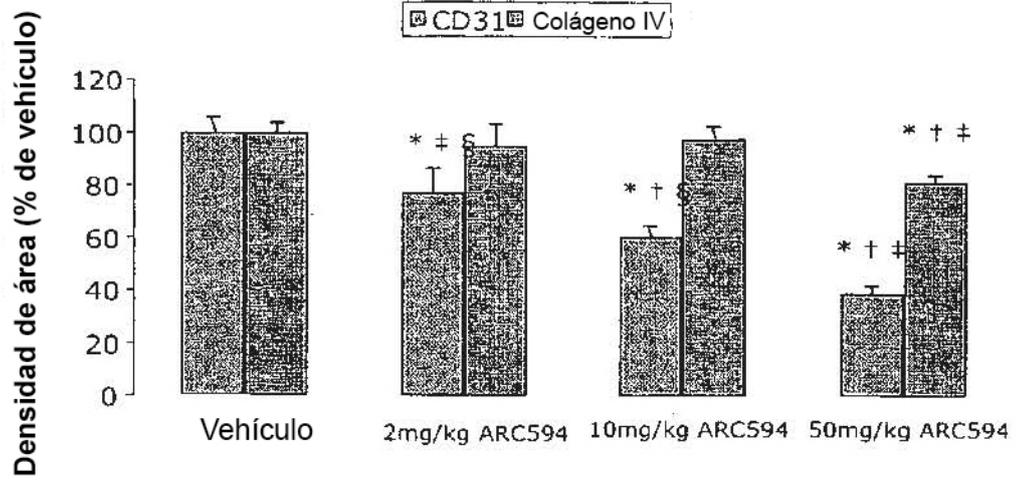


Figura 36

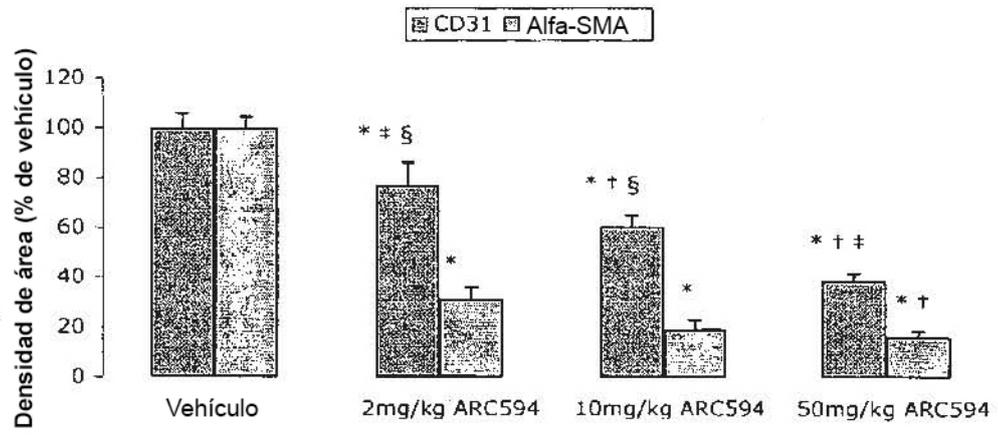


Figura 37

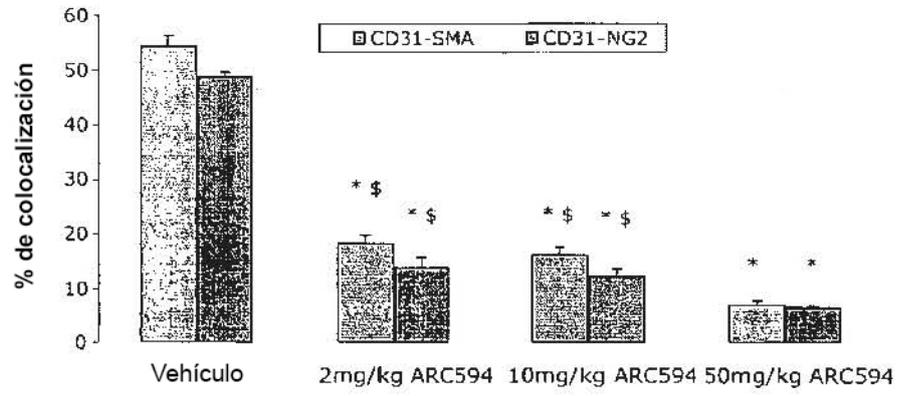


Figura 38

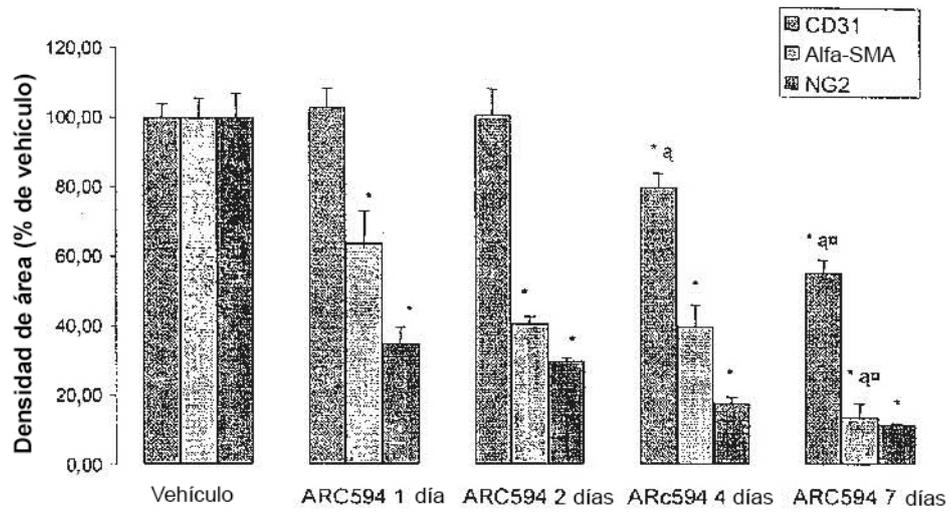


Figura 39

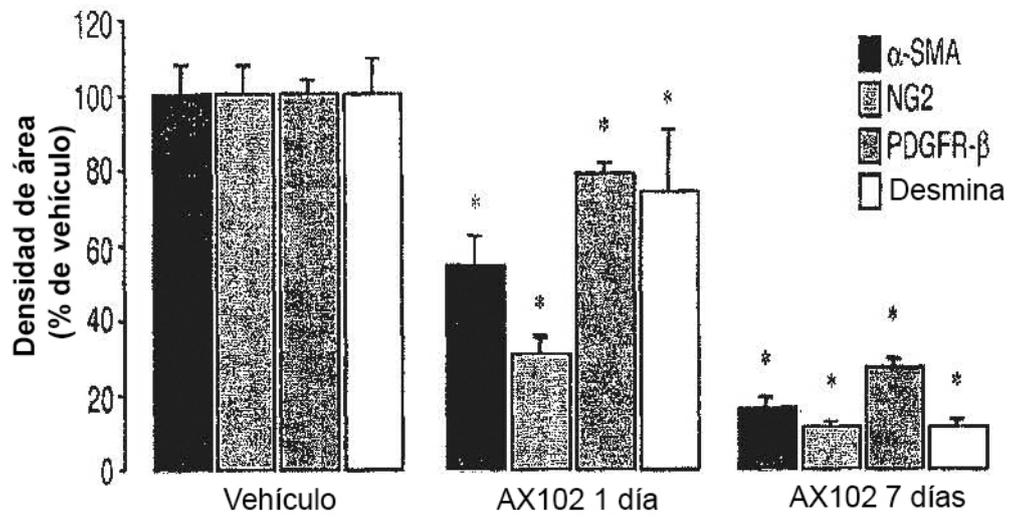


Figura 40

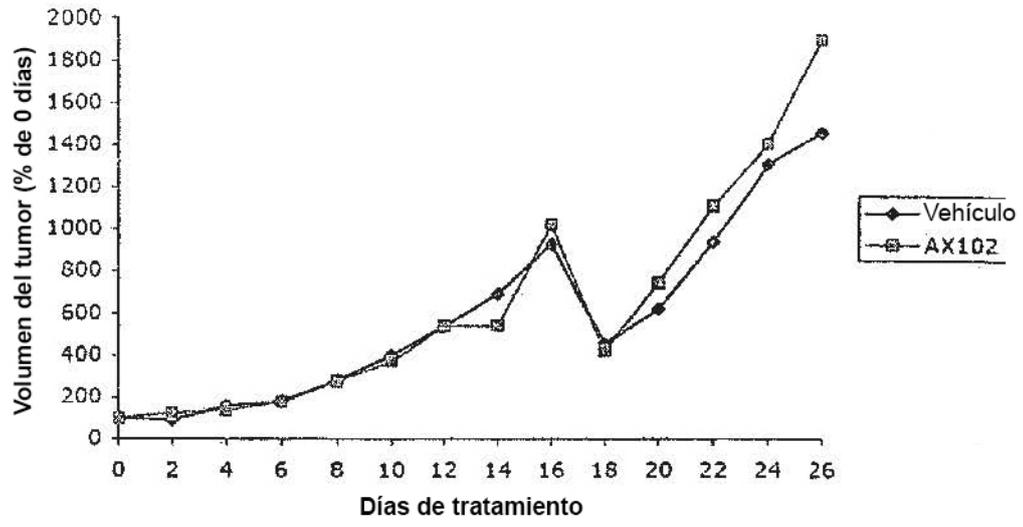


Figura 41

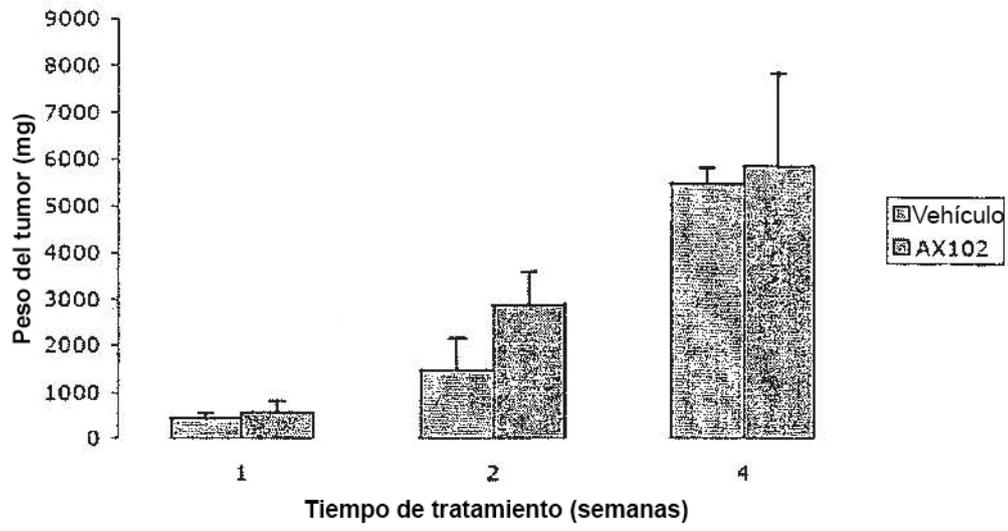


Figura 42

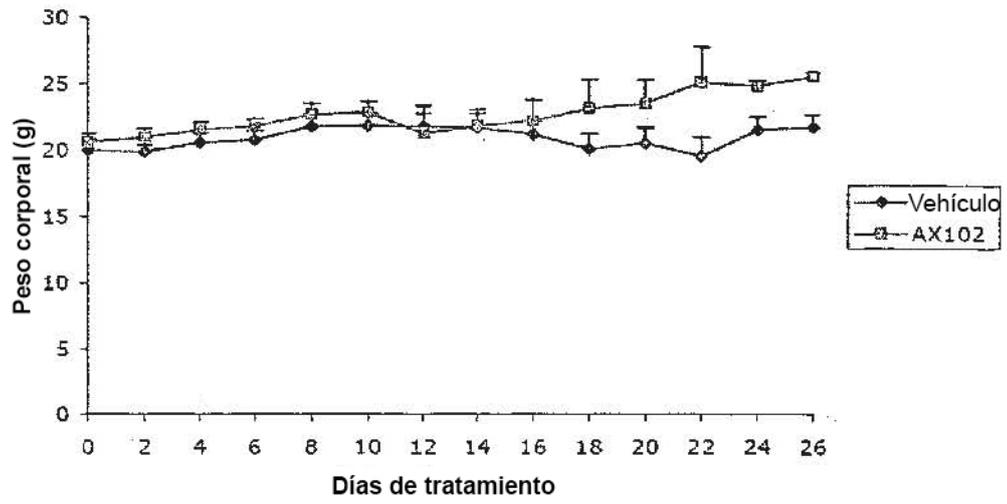


Figura 43

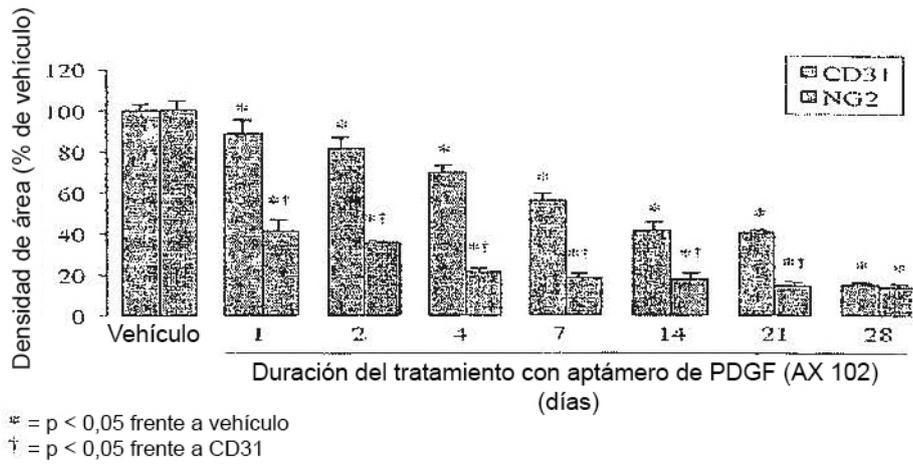


Figura 44

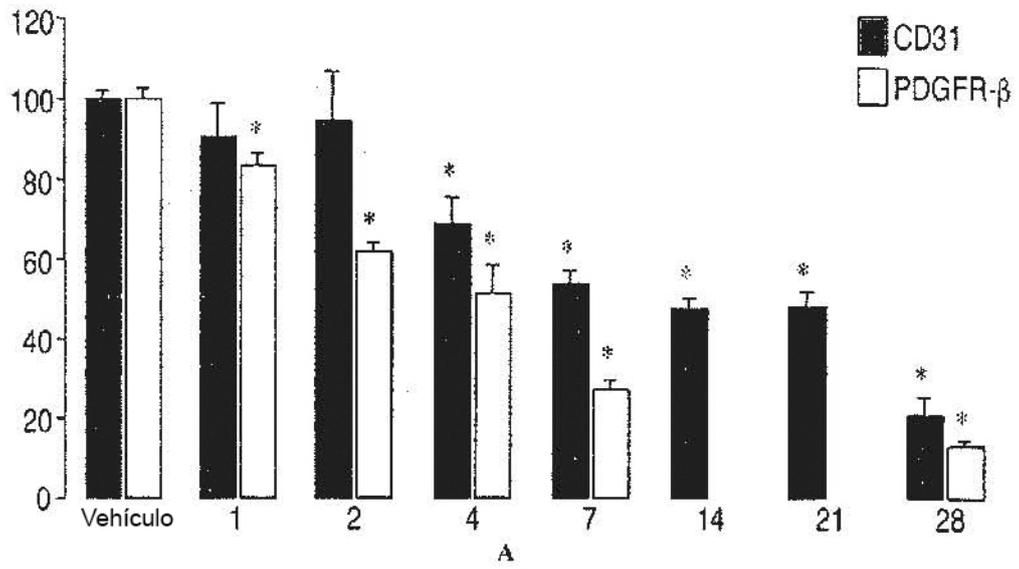


Figura 45

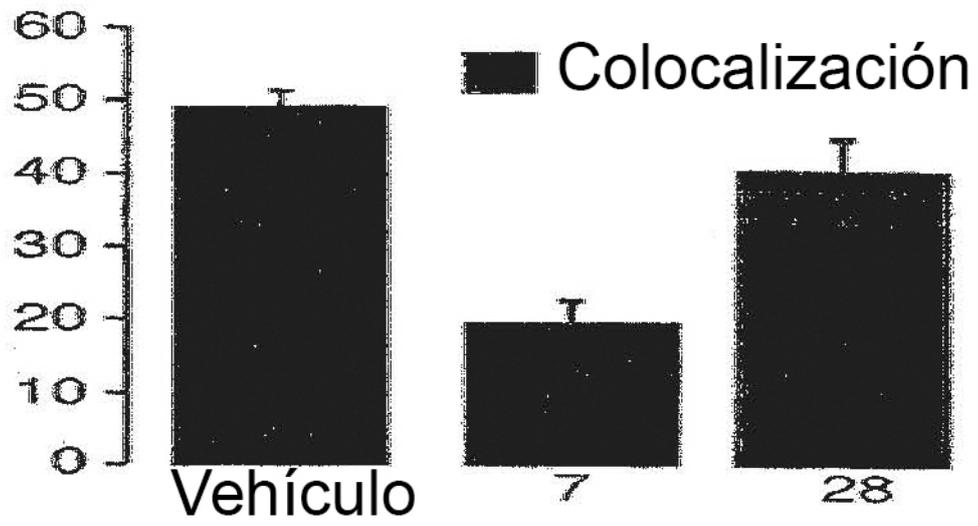


Figura 46

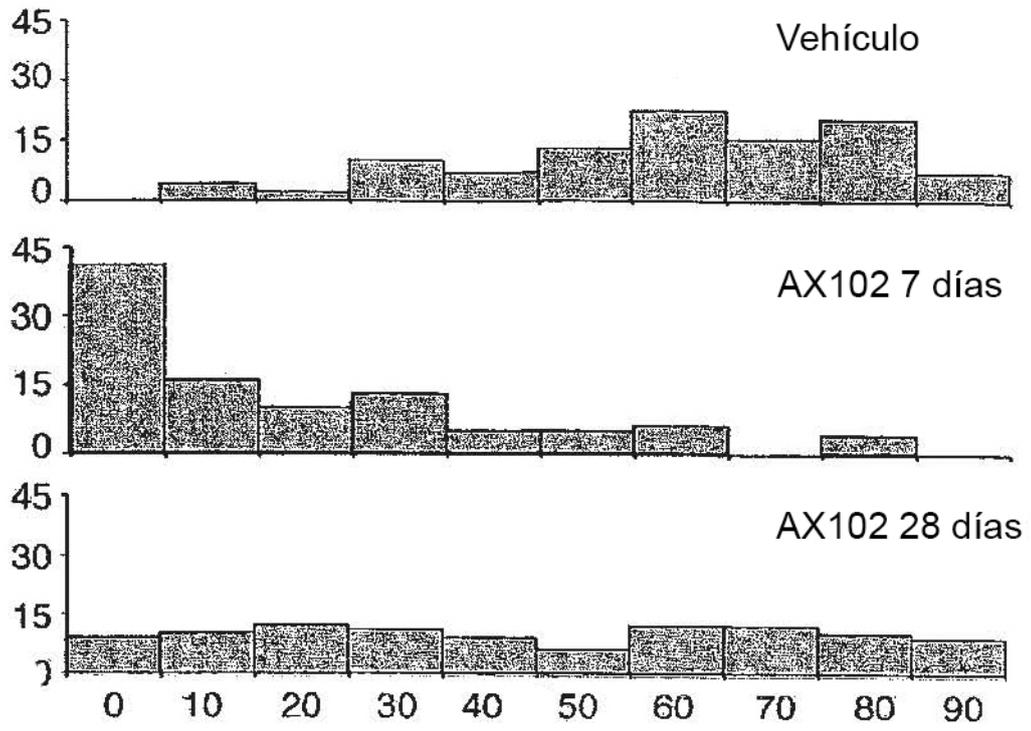


Figura 47

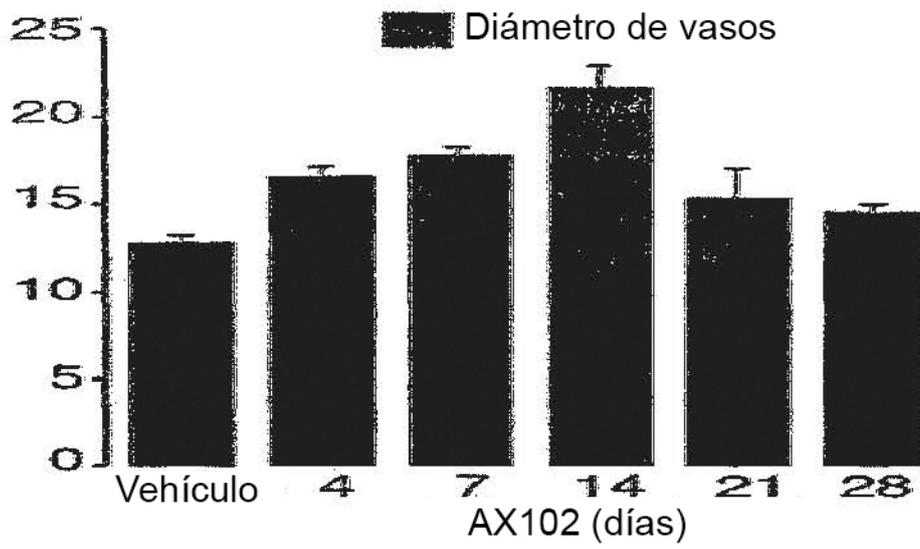


Figura 48

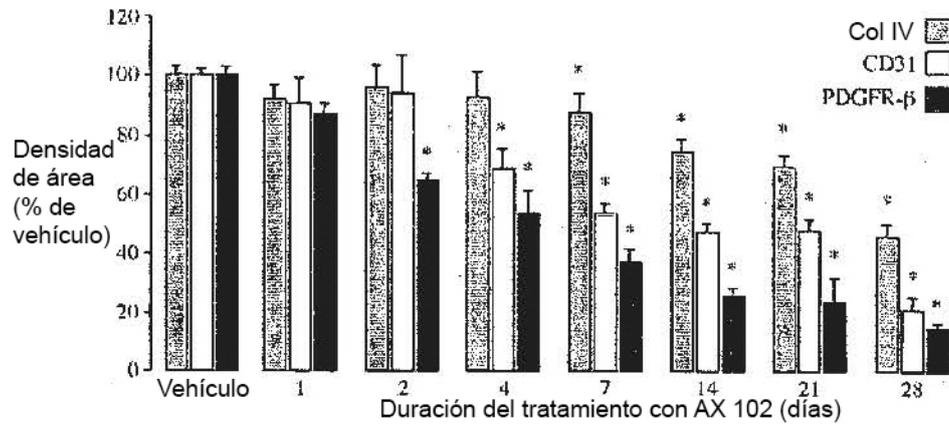


Figura 49

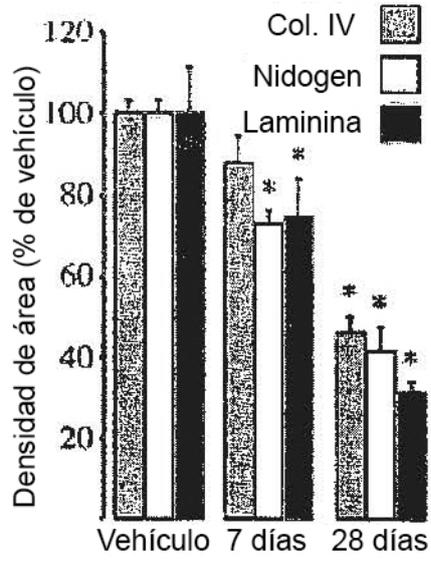


Figura 50

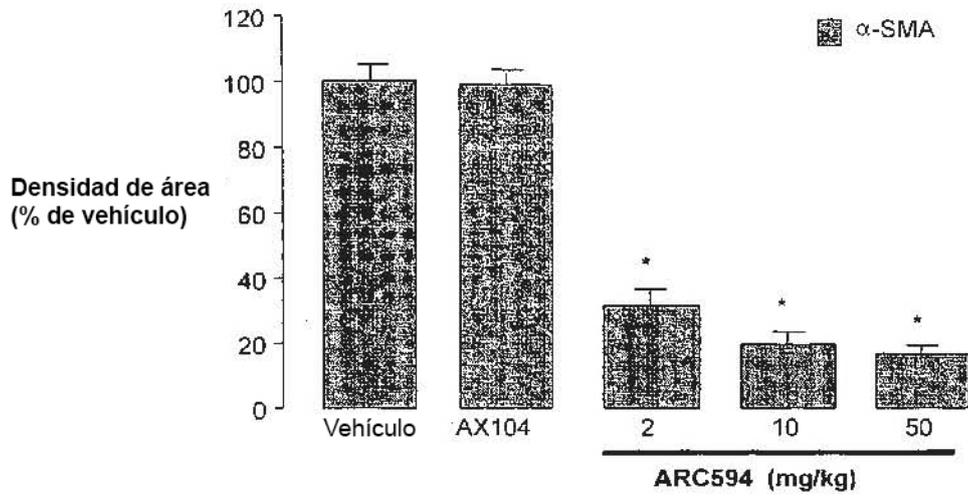


Figura 51

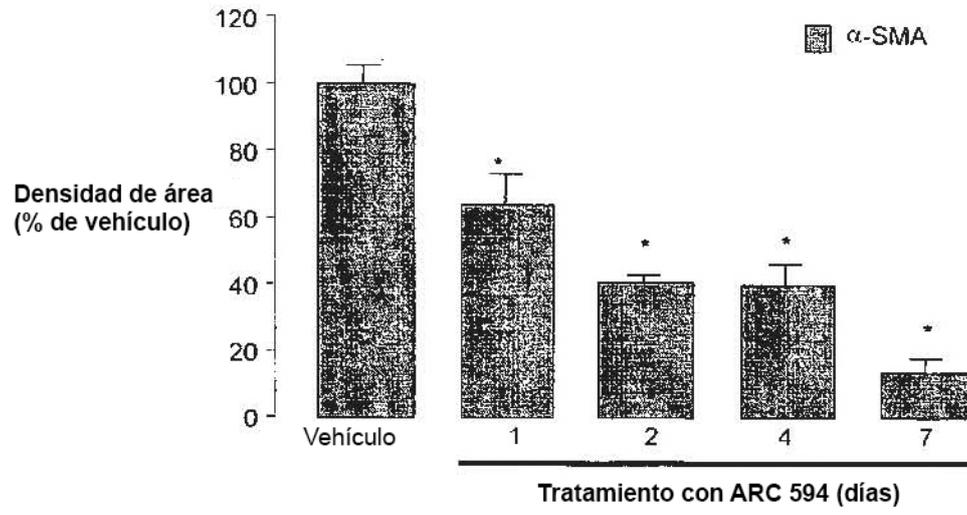


Figura 52

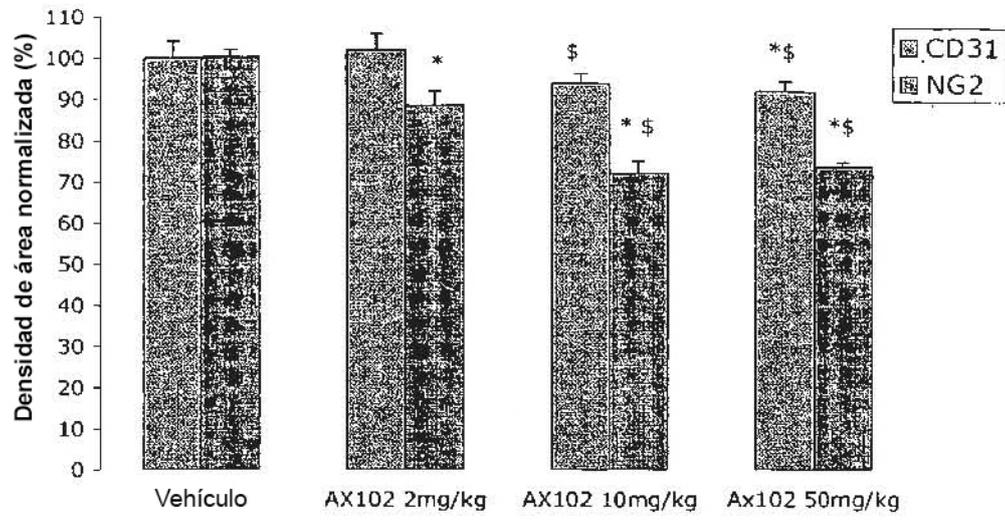


Figura 53

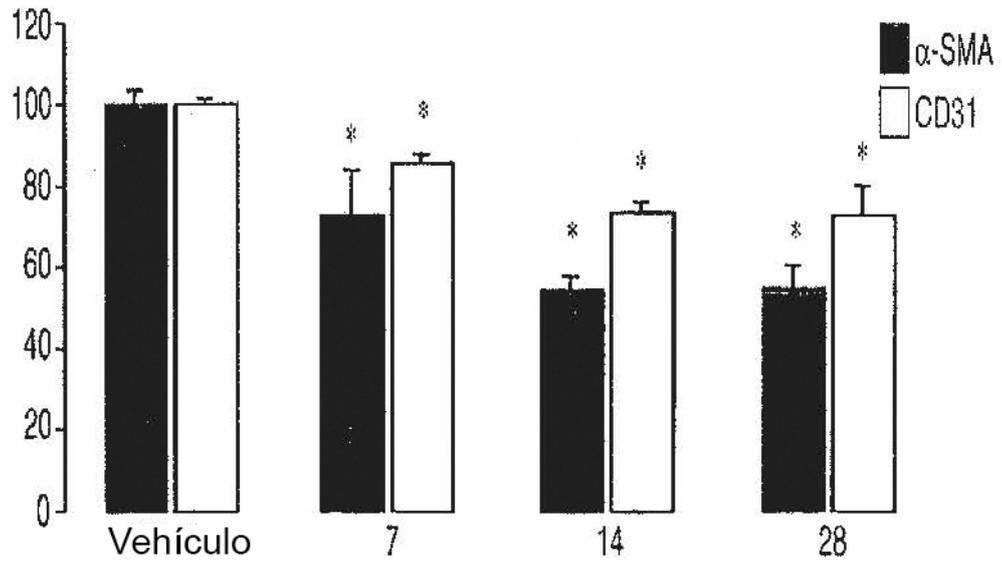


Figura 54

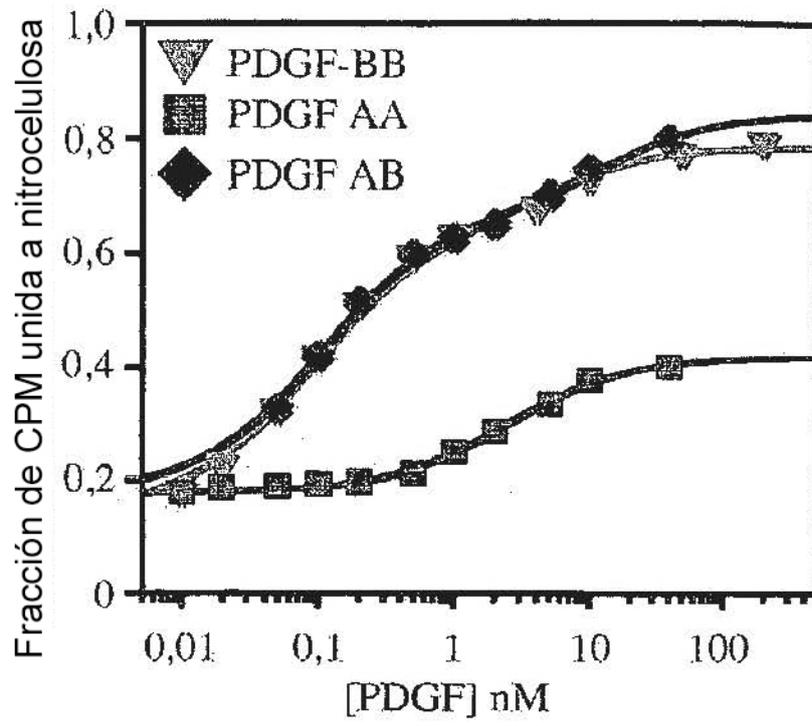


Figura 55

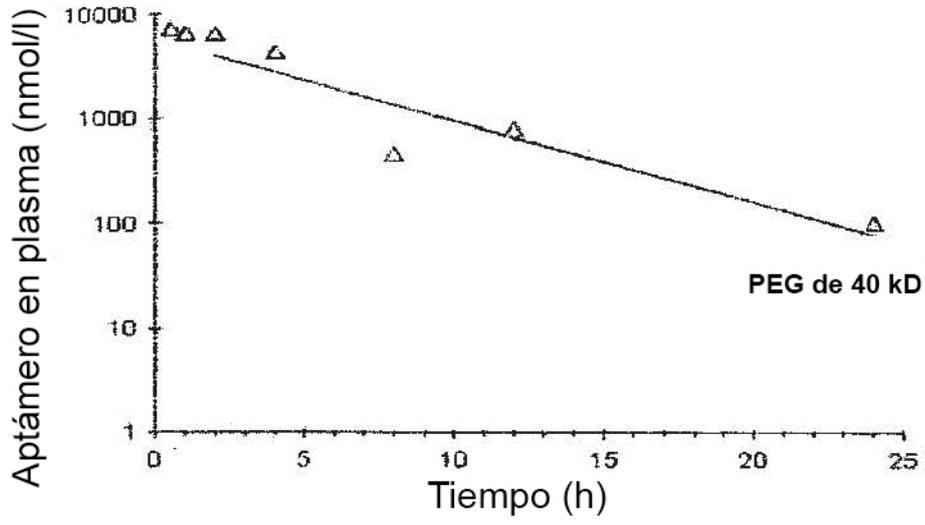


Figura 56A

| | PEG | C _{máx} ,
nM | CL
(mL/min
*kg) | t _{1/2}
(h) | C _{máx} | V _{ss}
(mL/kg) |
|-------|-----|--------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------|----------------------------|
| AX102 | 40K | 6731 | 0,315 | 3,75 | 673 | 93 |

Figura 56B

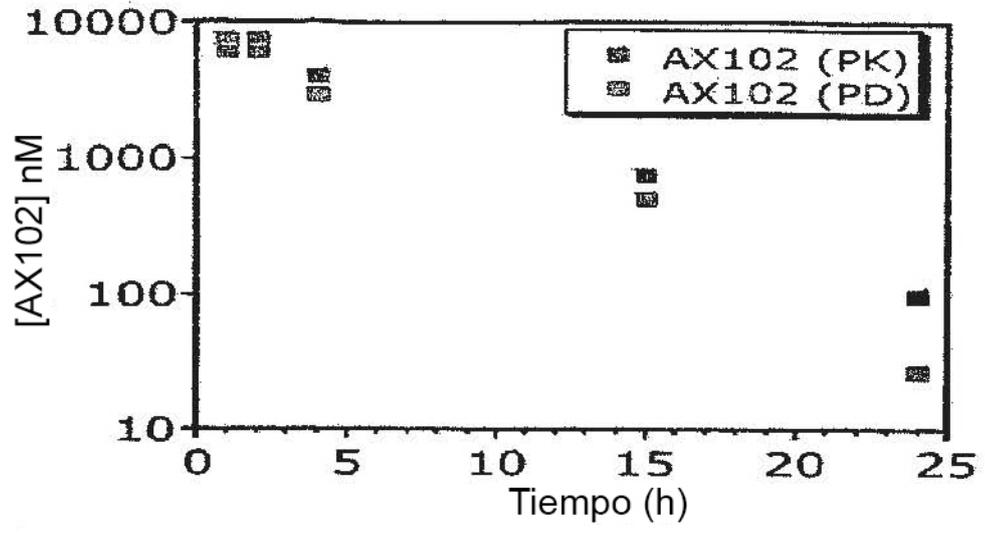


Figura 57