

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 384**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C40B 30/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2008 E 08745416 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **06.01.2010 EP 2140034**

54 Título: **Procedimiento de selección para ácidos nucleicos internalizantes en células**

30 Prioridad:

**09.04.2007 US 910792 P**

**01.11.2007 US 984656 P**

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

**31.01.2013**

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF  
TEXAS SYSTEM (100.0%)  
201 WEST SEVENTH STREET  
AUSTIN TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**ELLINGTON, ANDREW, D.;  
LEVY, MATTHEW;  
YAN, AMY y  
CHU, CHI-TAI**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 394 384 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

Procedimiento de selección para ácidos nucleicos internalizantes en células.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere en general a los campos de la biología molecular y la bioquímica. Más específicamente, la invención se refiere a la orientación de ácidos nucleicos y a procedimientos, composiciones y kits para la selección y suministro de moléculas que contienen ARN.

10

Antecedentes de la invención

[0002] Actualmente, el suministro de agentes a células requiere mecanismos de suministro coordinados que a menudo son tóxicos, ineficaces o altamente inespecíficos. Además, muchos agentes suministrados a células son tóxicos y requieren una internalización específica y rápida en la célula apropiada para evitar una toxicidad indeseada para el organismo.

15

[0003] Hicke BJ y col.: "Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein", *Journal of Biological Chemistry*, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc, EE.UU., vol. 276, nº 52, 28 de diciembre de 2001, dan a conocer un procedimiento Selex para identificar un aptámero para el ensayo de un ligando selectivo de tumor.

20

[0004] El documento WO 2005/111238 A2 (Archemix Corp [EE.UU.]; Epstein David [EE.UU.]; Pendergrast Shannon [EE.UU.]; Keef), 24 de noviembre de 2005, da a conocer un procedimiento de modulación del suministro intracelular de agentes terapéuticos usando aptámeros.

25

[0005] El documento WO 2006/096754 A2 (Archemix Corp [EE.UU.]; Diener John L [EE.UU.]; Hatala Paul [EE.UU.]; Killough Jas) da a conocer un procedimiento Selex para generar aptámeros para uso como productos terapéuticos de cáncer de próstata.

30

[0006] Cerchia Laura y col.: "Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase.", *Plos Biology*, abril de 2005 LNKD-PUBMED: 15769183, vol. 3, nº 4, abril de 2005, dan a conocer un procedimiento Selex para generar aptámeros resistentes a nucleasa.

35

[0007] Shangguan Dihua y col.: "Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study", *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, vol. 103, nº 32, agosto de 2006, dan a conocer un grupo de aptámeros que reconocen específicamente células de leucemia.

40

[0008] Ulrich Henning y col.: "In vitro Selection of RNA Aptamers That Bind to Cell Adhesion Receptors of Trypanosoma cruzi and Inhibit Cell Invasion", *Journal of Biological Chemistry*, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc, EE.UU., vol. 277 nº 23, 7 de junio de 2002, dan a conocer un procedimiento Selex para la generación de aptámeros con afinidad por receptores de parásitos.

45

Sumario de la invención

[0009] Existe la necesidad de identificación y selección de compuestos que puedan suministrar agentes a células con toxicidad y efectos inespecíficos reducidos sobre el organismo. Además, existe la necesidad de procedimientos de selección de compuestos que puedan internalizar rápidamente agentes en un tejido, célula o grupo de células predeterminado.

50

[0010] Al analizar los mecanismos de internalización celular, se ha descubierto que ciertas clases de moléculas pueden suministrar cargas moleculares a la célula. Este descubrimiento se ha explotado para proporcionar un procedimiento para seleccionar moléculas que contienen ARN internalizables como se define en las reivindicación. Según algunos aspectos, ciertos procedimientos permiten también la identificación de las moléculas internalizadas más rápidamente.

55

[0011] Se proporciona un procedimiento para la selección de moléculas que contienen ARN internalizables. El procedimiento supone poner en contacto una o más células (por ejemplo, células eucarióticas) o procarióticas con una colección aleatoria de moléculas que contienen ARN que comprende ácidos nucleicos estabilizados y que contiene regiones de secuencia constante. Las células que se ponen en contacto con la colección aleatoria se lavan y se exponen a una o más nucleasas, que son ARNasas o ribonucleasas. Se extrae el ARN total de las células y se multiplican los ácidos ribonucleicos internalizados. Se repite entonces el procedimiento. En algunas realizaciones, se repite el procedimiento de selección usando moléculas que contienen ARN identificadas en una ronda de selección. En otras realizaciones, se selecciona una molécula que contiene ARN internalizable usando dos o más rondas del procedimiento de selección. En ciertas realizaciones, se selecciona una molécula que contiene ARN internalizada usando al menos diez rondas del procedimiento de selección. En ciertas realizaciones, se ponen en contacto una o

60

65

más células con las moléculas que contienen ARN para reducir el periodo de tiempo de cada ronda posterior de selección. En realizaciones particulares, se ponen en contacto una o más células con las moléculas que contienen ARN internalizables durante menos de 24 horas, o menos de 10 horas, o menos de 5 horas, o menos de 2 horas, menos de 1 hora, menos de 30 minutos, menos de 20 minutos, menos de 10 minutos, menos de 2 minutos, menos de 1 minuto o menos de 30 segundos.

**[0012]** En realizaciones muy particulares, el procedimiento comprende aislar moléculas que contienen ARN internalizables mediante múltiples rondas de selección en que cada ronda posterior de selección implica exponer la molécula que contiene ARN internalizable de una ronda anterior de selección a las células durante un periodo de tiempo reducido en comparación con la ronda de selección anterior. Por ejemplo, la primera ronda de selección puede incluir exponer las moléculas que contienen ARN internalizables a las células durante 10 horas, la segunda ronda puede suponer exponer las moléculas que contienen ARN seleccionadas de la primera ronda a las células durante 5 horas, y exponer entonces las moléculas que contienen ARN seleccionadas en la segunda ronda a las células durante 2 horas y así en adelante. Dicho procedimiento identifica a aquellos compuestos que se internalizan más rápidamente en una célula de interés.

**[0013]** En otras realizaciones, la colección contiene ARN funcional de un conjunto de secuencias aleatorizadas. En ciertas realizaciones, cada ARN comprende al menos una secuencia aleatoria y al menos una secuencia constante. En realizaciones más particulares, los ARN comprenden dos o más secuencias constantes.

**[0014]** En más realizaciones, la secuencia aleatoria comprende al menos 10 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos, al menos 40 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos, al menos 60 nucleótidos, al menos 70 nucleótidos, al menos 80 nucleótidos, al menos 90 nucleótidos o más de 100 nucleótidos.

**[0015]** Los ARN estabilizados pueden ser conjuntos de ARN modificados con 2'-fluoro.

**[0016]** El procedimiento puede comprender la etapa de determinar la secuencia de los ácidos nucleicos internalizados. Esta etapa puede comprender secuenciación directa, reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa, unión a una matriz, espectrometría de masas y combinaciones de las mismas.

**[0017]** En realizaciones particulares, las nucleasas incluyen ARNasa A, ARNasa B, ARNasa C, ARNasa 1, ARNasa T1, ARNasa T2, ARNasa L, ARNasa H, ARNasa de angiogenina, ARNasa eosinofílica, nucleasa microcócica, ribonucleasa 1 de mamífero, ribonucleasa 2, ribonucleasa de ARN mensajero, 5'-3' exorribonucleasa, 3'-5' exorribonucleasa, una enzima de eliminación de caperuza, desadenilasa, ARNasa P, ARNasa III, ARNasa B, ARNasa I,<sup>\*</sup>, ARNasa HI, ARNasa HII, ARNasa M, ARNasa R, ARNasa IV, F; ARNasa P2,0, PIV, PC, ARNasa N, ARNasa II, PNPasa, ARNasa D, ARNasa BN, ARNasa T, ARNasa PH, oligoARNasa, ARNasa R, ARNasa Sa, ARNasa F1, ARNasa U2, ARNasa Ms o ARNasa St y combinaciones de las mismas o cócteles de nucleasas comercialmente disponibles. En otra realización, la nucleasa es ADNasa I, ADNasa IIa o ADNasa IIβ.

**[0018]** En ciertas realizaciones, las moléculas que contienen ARN se seleccionan para internalización en células que expresan el receptor CD4 (por ejemplo, HeLa). En otras realizaciones, se ligan las moléculas que contienen ARN seleccionadas con ARNip, toxinas, miARN, aptámeros o moléculas pequeñas para suministro a células que expresan CD4, tales como células HeLa.

**[0019]** En ciertos aspectos, se ha desarrollado un esquema de selección de ARN capaz de internalizarse en células sin la ayuda de mecanismos de transfección o suministro convencionales (por ejemplo, liposomas catiónicos, electroporación, reactivos de transfección, etc.). Este esquema puede adaptarse para producir ARN que se internalizan en células específicas, en diferentes estados de células o en células en general. Las moléculas que contienen ARN pueden seleccionarse para portar una variedad de diferentes cargas para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico o detección. Esto incluye cualquier serie de técnicas que impliquen el suministro de moléculas pequeñas a células o el marcaje de células incluyendo, pero sin limitación, modulación de la expresión génica, tal como estudios de silenciamiento génico de ARNip, suministro de fármacos mortales, análisis por FACS, detección de tumores, etc.

**[0020]** En otra realización, las células pueden tratarse para evitar una endocitosis activa.

**[0021]** Por facilidad de uso y en ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos se marcan detectablemente. El marcador puede ser un tinte o un marcador fluorescente, radiactivo o quimioluminiscente. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen uno o más cromóforos, una secuencia de ácido nucleico amplificable, una enzima, un péptido, un metal, una perla magnética, una perla polimérica, un dendrímero, un liposoma, un punto cuántico, una molécula de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia u otro ácido nucleico. En algunas realizaciones, las células se fijan antes de poner en contacto con la colección de moléculas que contienen ARN.

**[0022]** Las moléculas que contienen ARN pueden incluirse en o estar ligadas con una segunda molécula, por ejemplo, ARNip, miARN, moléculas pequeñas, toxinas u otras moléculas para suministro a una célula. Las moléculas que contienen ARN pueden conjugarse con una molécula orientada a internalización mediante hibridación,

conjugación covalente, biotilación, conjugación con estreptavidina, unión no específica, quelación, secuencias aminoacídicas específicas de diana y combinaciones de los mismos.

5 **[0023]** Las moléculas que contienen ARN pueden marcarse detectablemente. En particular, la molécula que contiene ARN puede ligarse operativamente con un marcador detectable tal como marcadores quimioluminiscentes, radiomarcadores o marcadores fluorescentes. La molécula que contiene ARN puede identificarse mediante FISH, FACS, micromatrices o microscopia *in vivo*.

10 **[0024]** Pueden seleccionarse ácidos nucleicos que no entren en la célula y permanezcan en disolución fuera de la célula. Pueden seleccionarse ácidos nucleicos que entren en la célula y vuelvan a salir de la célula, por ejemplo, mediante una ruta endocitótica cíclica.

15 **[0025]** Las moléculas que contienen ARN pueden comprender ARN, ADN, ARN modificado o un ácido nucleico quimérico. En ciertas realizaciones, las moléculas que contienen ARN son al menos parcialmente resistentes a nucleasa. Las moléculas que contienen ARN estabilizadas pueden comprender ácidos nucleicos modificados con 2'-fluoro. En algunas realizaciones, las moléculas que contienen ARN están ligadas con ARNip, miARN, moléculas pequeñas, toxinas o aptámeros. Los ácidos nucleicos de las moléculas que contienen ARN se marcan detectablemente en realizaciones particulares, tales como con un marcador fluorescente, radiactivo o quimioluminiscente.

20 **[0026]** En algunas realizaciones, la secuencia de moléculas que contienen ARN en la colección de secuencias aleatorias comprende al menos 10 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos, al menos 40 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos, al menos 60 nucleótidos, al menos 70 nucleótidos, al menos 80 nucleótidos, al menos 90 nucleótidos o más de 100 nucleótidos. En ciertas realizaciones, las moléculas que contienen ARN comprenden dos o más secuencias constantes.

25 **[0027]** La una o más nucleasas son ARNasas o ribonucleasas.

30 **[0028]** La una o más nucleasas pueden ser nucleasas microcócicas, 5'-3' exorribonucleasas, 3'-5' exorribonucleasas, enzimas de eliminación de caperuza, desadenilasa o combinaciones de las mismas. En otras realizaciones, la una o más nucleasas es una ADNasa tal como ADNasa I, ADNasa IIa, ADNasa IIβ o combinaciones de las mismas. La una o más nucleasas pueden mezclarse como un cóctel de nucleasas.

35 **[0029]** Las moléculas que contienen ARN pueden identificarse mediante FISH, FACS, micromatrices o microscopia fluorescente *in vivo*. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de tratar las células para prevenir una endocitosis activa. Además, puede determinarse la secuencia de los ácidos nucleicos internalizados.

40 **[0030]** La secuenciación puede realizarse mediante secuenciación directa, reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa, micromatrices, espectrometría de masas o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de fijar las células antes de poner en contacto con la colección de ácidos nucleicos.

#### 45 Breve descripción de los dibujos

**[0031]** Para una comprensión más completa de los rasgos y ventajas de la presente invención, se hace referencia ahora a la descripción detallada de la invención junto con las figuras adjuntas y en que:

50 La Figura 1 muestra un esquema de selección para internalizar ácidos nucleicos según una realización.

La Figura 2 es una gráfica que muestra que el procedimiento de selección enriquece en ARN internalizantes.

55 La Figura 3 es una gráfica que muestra la progresión de la capacidad de las rondas de PSMA dopado de suministrar conjugados de lamina A/C-ARNip a células.

La Figura 4 es una gráfica que muestra que los clones de aptámero de PMSA dopado suministran eficazmente conjugados de lámina A/C-ARNip a células.

60 La Figura 5 es una gráfica que muestra la progresión de la selección de internalización del conjunto N30 en células HeLa-CD4.

#### Descripción detallada de la invención

65 **[0032]** La bibliografía de patentes y científica designada en la presente memoria establece el conocimiento que está disponible para los especialistas en la materia.

**[0033]** Aunque se discuten con detalle a continuación la preparación y uso de diversas realizaciones de la presente invención, se apreciará que muchos conceptos aplicables pueden plasmarse en una amplia variedad de contextos específicos. Las realizaciones específicas discutidas en la presente memoria son meramente ilustrativas de modos específicos de preparación y uso de la invención y no delimitan el alcance de la invención.

**[0034]** Se incluyen composiciones, procedimientos y kits que permiten una rápida selección de ácidos nucleicos aislados (ADN, ARN y modificaciones de los mismos) independientemente de la secuencia que se internalizan fácilmente en un tipo de célula particular. Una vez seleccionadas y aisladas, pueden determinarse las secuencias de las moléculas que contienen ARN. Las moléculas que contienen ARN pueden usarse para potenciar mecanismos de suministro de moléculas terapéuticas o fármacos específicos para depositar compuestos específicos en células cancerosas (por ejemplo para destruirlas) o de productos terapéuticos para tratar infecciones u otras enfermedades asociadas a células dañadas por patógenos. Los procedimientos descritos en la presente memoria son de gran valor para aumentar la eficacia del producto o reducir la toxicidad.

**[0035]** Se incluyen en la presente memoria composiciones y procedimientos para seleccionar moléculas que contienen ARN que pueden internalizarse en células sin la ayuda de mecanismos de transfección o suministro convencionales. Estos procedimientos se adaptan para producir moléculas que contienen ARN que se internalizan en células específicas, diferentes estados de células (por ejemplo, diferenciación) o en células en general. Las ventajas de la presente invención son que las moléculas que contienen ARN pueden seleccionarse para ser específicas de diana y, en algunas realizaciones, no tienen toxicidad asociada. Las moléculas que contienen ARN internalizables pueden usarse para orientar una "carga útil" o "carga" a una célula o tejido específico en algunas realizaciones sin necesidad de caracterizar las células o las moléculas que contienen ARN en gran medida. Las moléculas que contienen ARN internalizables pueden usarse también para señalar el estado interno de la célula sin comprometer la integridad estructural de la célula o tejido.

**[0036]** El término "gen" se usa para designar una unidad codificadora de proteína, polipéptido o péptido funcional. Como se usa en la presente memoria, "gen" es un término funcional que incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc o fragmentos o combinaciones de las mismas, así como productos génicos, incluyendo aquellos que pueden haberse alterado por la mano del hombre. Se usan genes, ácidos nucleicos, proteínas y similares purificados para designar dichas entidades cuando se identifican y separan de al menos un ácido nucleico o proteína contaminante con el que está habitualmente asociado. El término "secuencias", como se usa en la presente memoria, se usa para designar nucleótidos o aminoácidos tanto naturales como artificiales, por ejemplo, ácidos nucleicos o aminoácidos modificados. "Ácidos nucleicos transcritos" designa ácidos ribonucleicos producidos a partir de un molde de secuencia de ácido nucleico correspondiente. El término "gen" engloba tanto las formas de ADNc como genómica de un gen. Un gen puede producir múltiples especies de ARN que se generan mediante corte y empalme diferencial del transcrito de ARN primario.

**[0037]** Como se usa en la presente memoria, el término "multiplicar" significa amplificar la cantidad de una molécula diana en una muestra. Las moléculas diana incluyen, pero sin limitación, miARN, ARNip y ARN bicatenario. Los procedimientos ejemplares de amplificación incluyen PCR, PCR-TI, transcripción *in vitro* y técnicas de clonación estándares.

**[0038]** Como se usa en la presente memoria, el término "amplificar", cuando se usa con referencia a ácidos nucleicos, designa la producción de un gran número de copias de una secuencia de ácido nucleico mediante cualquier procedimiento conocido en la materia. El término "amplificación" designa generalmente reacciones que implican biomoléculas de ácido nucleico tales como ARN y ADN. "Amplificación de ácido nucleico" designa generalmente cualquier proceso para aumentar la concentración de ácido nucleico y, en particular, la concentración de un ácido nucleico seleccionado y/o un trozo definido de un ácido nucleico seleccionado. "Productos amplificados o de amplificación" o "amplicones" definen generalmente los productos resultantes de la ejecución de una reacción de amplificación de ácido nucleico.

**[0039]** Los términos "complementario" o "complementariedad", como se usan en la presente memoria, designan la unión natural de polinucleótidos en condiciones salinas y de temperatura permisivas mediante apareamiento de bases con otros ácidos nucleicos. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" se une con la secuencia complementaria "T-C-A". La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser parcial, en que se unen solo algunos de los ácidos nucleicos, o puede ser completa cuando existe una complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre las hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y fuerza de la hibridación entre hebras de ácido nucleico. Esto es particularmente importante en las reacciones de amplificación, que dependen de la unión entre hebras de ácido nucleico.

**[0040]** Como se usa en la presente memoria, el término "internalizable" designa un ácido nucleico, tal como una molécula que contiene ARN o ácido nucleico modificado, que se une a una célula y tiene la capacidad de entrar o internalizarse en la célula sin la ayuda de agentes o condiciones externos (por ejemplo, coprecipitación de ADN con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y biolística). En algunos casos, la molécula que contiene ARN internalizable se ha internalizado en una célula antes de

detectar su internalización. Además, el ácido nucleico internalizable puede usarse junto con agentes o condiciones que aumenten la tasa de internalización después de seleccionar para internalización los ácidos nucleicos originales.

**[0041]** Como se usa en la presente memoria, el término “molécula que contiene ARN” significa una molécula que contiene al menos una porción de ARN o ARN modificado. Las moléculas que contienen ARN pueden estar compuestas por múltiples segmentos ligados conjuntamente. Las moléculas que contienen ARN pueden unirse a una carga tal como un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína, una molécula pequeña, un ácido graso y/o un anticuerpo. En ciertas realizaciones, las moléculas que contienen ARN son una sola molécula que tiene al menos una porción de ARN. En algunas realizaciones, la molécula que contiene ARN contiene también una carga de ARN, tal como ARNip o microARN.

**[0042]** En ciertas realizaciones, la molécula que contiene ARN se une a una carga mediante un ligamiento, dependiendo del tipo de carga. Por ejemplo, dichos ligamientos pueden incluir ligamientos ditiol entre el ARN y la carga tales que, tras la entrada en el entorno reducido de la célula, pueda escindirse la carga. Son otros ligamientos útiles ligamientos fosfodiéster, ligamientos fosforotioato, fosfonatos de alquilo, fosforamiditas, carbamatos, carbonatos, ésteres de fosfato, acetamida y ésteres de carboximetilo (véanse, por ejemplo, Agrawal y col., (1987) Tetrahedron Lett. 28: 3539 – 3542; Agrawal y col., (1988) PNAS (USA) 85: 7079 – 7083; Uhlmann y col., (1990) Chem. Rev. 90: 534 – 583; Agrawal y col., (1992) Trends Biotechnol. 10: 152 – 158).

**[0043]** Los compuestos que contienen ARN pueden ligarse también con cargas mediante un péptido HA o compuestos similares, o con péptidos fusogénicos que permitirían a las cargas salir de los endosomas; o con elementos fotolíticas que permiten la escisión de las cargas de los compuestos que contienen ARN cuando se exponen a una longitud de onda de luz particular.

**[0044]** Como se usa en la presente memoria, el término “cebador” designa un oligonucleótido, tanto de origen natural como en una digestión de restricción purificada, como producido sintéticamente, que pueda actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se dispone en condiciones en que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario de una hebra de ácido nucleico (concretamente, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados). El cebador puede ser monocatenario para una máxima eficacia de amplificación, pero puede ser como alternativa bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata en primer lugar para separar sus hebras antes de usarse para preparar productos de extensión. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. La longitud exacta de los cebadores dependerá de muchos factores, incluyendo temperatura, fuente del cebador y el uso del procedimiento.

**[0045]** Como se usan en la presente memoria, los términos “proteína”, “polipéptido” o “péptido” designan compuestos que comprenden aminoácidos enlazados mediante enlaces peptídicos y se usan intercambiamente.

**[0046]** Como se usa en la presente memoria, una “colección aleatoria” designa una colección de oligonucleótidos, tales como moléculas que contienen ARN, que incluyen secuencias diferentes. Cada miembro de la colección puede ser al menos parcialmente aleatorio, pero puede tener también una o más secuencias o regiones de secuencia comunes y/o conocidas. Por ejemplo, la colección puede ser completamente aleatoria, aleatoria en parte, aleatoria en ciertas posiciones de los ácidos nucleicos, aleatoria en cuanto a longitud y/o mono- o dicatenaria. La colección de ácidos nucleicos aleatorios puede prepararse sintéticamente, combinatoriamente o provenir de fuentes naturales.

**[0047]** Como se usa en la presente memoria, el término “marcadores detectables” designa compuestos y/o elementos que pueden detectarse debido a sus propiedades funcionales y/o características químicas específicas, cuyo uso permite detectar el agente al que están unidos y/o cuantificarlo adicionalmente si se desea, tales como una enzima, un anticuerpo, un ligador, un radioisótopo, una partícula rica en electrones, una partícula magnética y/o un cromóforo o combinaciones de los mismos, por ejemplo, en transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Hay muchos tipos de marcadores detectables, incluyendo marcadores fluorescentes, que son de fácil manejo, baratos y no tóxicos.

**[0048]** Como se usa en la presente memoria, el término “poner en contacto” designa exponer una colección de oligonucleótidos a una o más dianas, por ejemplo células o tejidos, durante cierto periodo de tiempo, lo que conduce a la internalización de algunos o todos de los ácidos nucleicos sin necesidad de agentes o condiciones secundarios.

**[0049]** Como se usa en la presente memoria, el término “célula diana” designa cualquier célula (por ejemplo, eucariótica o procariótica) con que se pone en contacto el conjunto de ácidos nucleicos para internalización en una célula. Como se usa en la presente memoria, la internalización se define por la función del ácido nucleico, a saber, que el ácido nucleico es internalizable y/o se internaliza sin necesidad de un vector orientador ni ningún agente o condición secundario que facilite la entrada del ácido nucleico en la célula diana.

**[0050]** Se dan a conocer composiciones, procedimientos y kits para aislar y caracterizar moléculas que contienen ARN que son específicas de diana y se internalizan rápidamente. Las composiciones y procedimientos

dados a conocer en la presente memoria permiten el rápido aislamiento de ácidos nucleicos capaces de internalizarse en células sin la ayuda de mecanismos de transfección o suministro convencionales (por ejemplo, liposomas catiónicos, electroporación, reactivos de transfección, etc.). El procedimiento puede adaptarse para producir ARN que se internalizan en células específicas, diferentes estados de células o en células en general. Los ARN pueden seleccionarse para portar una variedad de diferentes cargas para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico o detección. Esto incluye cualquier serie de técnicas que impliquen el suministro de moléculas pequeñas a células o el marcaje de células incluyendo, pero sin limitación: modulación de la expresión génica, tal como estudios de silenciamiento génico de ARNip, suministro de fármacos mortales, análisis por FACS, detección de tumores, etc.

**[0051]** En realizaciones particulares, las células puestas en contacto con la colección aleatoria incluyen células aisladas a partir de tejidos o células propagadas *ex vivo* (por ejemplo, líneas celulares). En realizaciones más particulares, las células pueden ser células cancerosas incluyendo, pero sin limitación, células de linfoma, células de melanoma, células de sarcoma, células de leucemia, células de retinoblastoma, células de hepatoma, células de mieloma, células de glioma, células de mesotelioma y células de carcinoma.

**[0052]** En otras realizaciones, las células pueden ser líneas celulares. Las líneas celulares ejemplares incluyen, pero sin limitación, HeLa, MCF7, MDA, SKOV3, OVCAR3, 2008, PC3, T84, HCT-116, H69, H460, HeLa y MOLT4. Las líneas celulares pueden generarse también mediante técnicas bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Griffin y col., (1984) *Nature* 309 (5963): 78 – 82).

**[0053]** Además, las células puestas en contacto con la colección aleatoria incluyen células procarióticas (concretamente, células bacterianas). El procedimiento descrito en la presente memoria puede usarse para identificar moléculas que contienen ARN que suministran cargas a e internalizan cargas (concretamente, agentes tales como moléculas pequeñas, anticuerpos, proteínas, péptidos, ácidos grasos, agentes terapéuticos, antibióticos o agentes tóxicos) en células bacterianas. Los procedimientos descritos en la presente memoria pueden usarse también para identificar moléculas que contienen ARN que pueden suministrar cargas a e internalizar cargas en células fúngicas.

**[0054]** En ciertos aspectos, los procedimientos proporcionados en la presente memoria permite seleccionar moléculas que contienen ARN internalizables. Dichas moléculas que contienen ARN tienen la capacidad de internalizarse en células y llevar cargas (por ejemplo, fármacos, agentes citotóxicos y agentes apoptóticos) a las células seleccionadas. Los procedimientos incluyen poner en contacto células con una colección aleatoria de moléculas que contienen ARN, que pueden modificarse para aumentar la estabilidad.

**[0055]** Las células puestas en contacto pueden lavarse con un agente desnaturizante para retirar las moléculas que contienen ARN en exceso adheridas a la superficie de las células. Los lavados útiles incluyen agentes desnaturizantes tales como detergentes aniónicos tales como dodecilsulfato de sodio (SDS), detergentes no iónicos tales como Tween-20® y detergentes catiónicos tales como bromuro de hexadeciltrimetilamonio, todos los cuales están comercialmente disponibles (Sigma Corp., St. Louis, MO).

**[0056]** Se ha descubierto que pueden usarse nucleasas para retirar las moléculas que contienen ARN que no se han internalizado. Este resultado era sorprendente, considerando que las moléculas que contienen ARN están generalmente estabilizadas frente a la degradación debido a las modificaciones descritas más detalladamente a continuación y a las estructuras secundarias. Debido a este descubrimiento, ciertas realizaciones del procedimiento suponen exponer células puestas en contacto con colecciones aleatorias a una nucleasa o mezcla de nucleasas para retirar las moléculas que contienen ARN que permanecen en la superficie de las células y que no se han internalizado en las células. Los ejemplos de nucleasas incluyen, pero sin limitación, ARNasa A, ARNasa B, ARNasa C, ARNasa 1, ARNasa T1, ARNasa T2, ARNasa L, ARNasa H, ARNasa de angiogenina, ARNasa eosinofílica, nucleasa microcócica, ribonucleasa 1 de mamífero, ribonucleasa 2, ribonucleasa de ARN mensajero, 5'-3' exorribonucleasa, 3'-5' exorribonucleasa, una enzima de eliminación de caperuza, una desadenilasa, ARNasa P, ARNasa III, ARNasa B, ARNasa I, I\*, ARNasa HI, ARNasa HII, ARNasa M, ARNasa R, ARNasa IV, F; ARNasa P2.0, PIV, PC, ARNasa N, ARNasa II, PNPasa, ARNasa D, ARNasa BN, ARNasa T, ARNasa PH, oligoARNasa, ARNasa R, ARNasa Sa, ARNasa FI, ARNasa U2, ARNasa Ms o ARNasa St y combinaciones de las mismas. En otras realizaciones, la nucleasa es una ADNasa I, ADNasa Ila o ADNasa IIβ. Los ócteles de ARNasa pueden obtenerse comercialmente de Ambion Corp. (Austin, TX), New England BioLabs (Ipswich, MA) y Epicenter Technologies (Madison, WI).

**[0057]** En realizaciones particulares, el procedimiento se repite múltiples veces para obtener aquellas moléculas que contienen ARN que son las moléculas más rápidamente internalizadas frente al conjunto original de moléculas que contienen ARN. En estas realizaciones, se añade un conjunto de ácidos nucleicos a las células y se incuban con las células durante periodos decrecientes de tiempo en el transcurso del proceso de selección (concretamente, se efectúa repetidamente el procedimiento descrito anteriormente). Después de completar el curso temporal, se lavan las células varias veces y/o se tratan con una etapa de aplicación de nucleasa.

**[0058]** En ciertas realizaciones, las células puestas en contacto pueden incubarse con moléculas que

contienen ARN durante periodos decrecientes de tiempo. Puede efectuarse un lavado para retirar las moléculas que contienen ARN que no se han internalizado al cabo de entre 1 hora y 24 horas o más, después de poner en contacto las células con las moléculas que contienen ARN. Cada lavado exitoso puede efectuarse en periodos decrecientes de tiempo después de poner en contacto las células con las moléculas que contienen ARN. Las células puestas en contacto pueden incubarse con moléculas que contienen ARN durante cualquier periodo de tiempo. Los periodos de tiempo incluyen, pero sin limitación, de 1 minuto a 10 minutos, de 11 minutos a 20 minutos, de 21 minutos a 30 minutos, de 31 minutos a 40 minutos, de 41 minutos a 50 minutos, de 51 minutos a 1 hora, de 1 hora a 2 horas, de 2 horas a 3 horas, de 3 horas a 4 horas, de 4 horas a 5 horas, de 5 horas a 6 horas, de 6 horas a 7 horas, de 7 horas a 8 horas, de 8 horas a 9 horas, de 9 horas a 10 horas, de 10 horas o más, de 15 horas o más, de 20 horas o más o de 24 horas o más.

**[0059]** En una realización ejemplar, se eligen las moléculas que contienen ARN mediante un primer lavado en que las células puestas en contacto con moléculas que contienen ARN se incuban durante 24 horas. Se lavan las células puestas en contacto, se aíslan las moléculas que contienen ARN internalizadas y se ponen en contacto con células durante 1 hora. Se lavan esas células y se aíslan las moléculas que contienen ARN internalizadas. Se ponen en contacto las moléculas puestas en contacto con ARN aisladas con células durante 30 minutos antes de lavar. Se aíslan de nuevo las moléculas que contienen ARN internalizadas y se continúa el proceso con periodos decrecientes de incubación antes de lavar.

**[0060]** En ciertas realizaciones, se extrae el ARN total de las células y cualquier secuencia que se haya internalizado puede recuperarse mediante PCR-FI y/o transcripción. Esas moléculas que contienen ARN representan el conjunto de moléculas que se internaliza más rápidamente en las células.

**[0061]** Las moléculas que contienen ARN pueden prepararse usando cualquier procedimiento conocido en la materia. Por ejemplo, pueden producirse sintéticamente usando el sintetizador de ácidos nucleicos Expedite™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) u otros dispositivos similares (véase, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA). Pueden producirse también oligonucleótidos sintéticos usando procedimientos bien conocidos en la materia tales como los procedimientos de fosforamidita (véase, por ejemplo, Pan y col., (2004) Biol. Proc. Online, 6: 257 – 262), la metodología de H-fosfonato (véase, por ejemplo, Agrawal y col., (1987) Tetrahedron Lett. 28 (31): 3539 – 3542) y los procedimientos de triéster de fosfito (Nucleic Acids Res. (1984), 12: 4539; (1983) Tetrahedron Lett. 24: 5843).

**[0062]** Las moléculas que contienen ARN pueden unirse a ligadores tales como ligadores 3' amino o ligadores 5' amino sin cambiar la funcionalidad de las moléculas que contienen ARN. También pueden unirse nucleótidos adicionales al extremo 3' de las moléculas que contienen ARN durante la síntesis de ácido nucleico con el fin de actuar como ligador (véase, por ejemplo, Steinberg y col., (2004) Biopolymers 73 (5): 597 – 605).

**[0063]** Adicionalmente, las moléculas que contienen ARN pueden modificarse de una serie de modos que no comprometan su capacidad de internalizar en una célula. Las modificaciones en la estructura de ácido nucleico pueden incluir ligamientos sintéticos tales como fosfonatos de alquilo, fosforamiditas, carbamatos, fosforotioatos, fosforditioatos, carbonatos, ésteres de fosfato, acetamida y ésteres carboximiléticos (véanse, por ejemplo, Agrawal y col., (1987) Tetrahedron Lett. 28: 3539 – 3542; Agrawal y col., (1988) PNAS (USA) 85: 7079 – 7083; Uhlmann y col., (1990) Chem. Rev. 90: 534 – 583; Agrawal y col., (1992) Trends Biotechnol. 10: 152 – 158). Adicionalmente, las modificaciones de ácido nucleico incluyen ligamientos de fosfato internucleosídicos tales como ligamientos de colesterilo o compuestos diamina de números variables de residuos de carbono entre los grupos amino y la ribosa terminal. Otras modificaciones de las moléculas que contienen ARN incluyen cambios en el resto de azúcar tal como arabinosa o ácidos nucleicos 3',5' sustituidos que tienen un azúcar unido en su extremo 3' y 5' a través de un grupo químico distinto de un grupo hidroxilo. Por lo tanto, las modificaciones que no comprometen la internalización o suministro de carga de la molécula que contiene ARN están dentro del alcance de la invención.

**[0064]** Las moléculas que contienen ARN pueden sintetizarse también usando química de ADN en fase sólida estándar, que es bien conocida en la materia. La siguiente descripción muestra un procedimiento ejemplar de producción de conjuntos de ARN. Las posiciones aleatorias se generan mezclando fosforamiditas para A, C, G y U a una relación molar de 3: 3: 2: 2,4 de tal modo que la eficacia de acoplamiento de cada base sea aproximadamente igual, y la composición final de una posición aleatoria tenga un 25 % de posibilidad de ser A, C, G o U. En el caso de conjuntos dopados, la mezcla de fosforamiditas puede usarse adicionalmente para generar conjuntos adicionales con A dopada, C dopada, G dopada y U dopada, tales que cada eficacia de acoplamiento para cualquier nucleótido dopado sea de 70 %, con un 10 % de eficacia para los 3 nucleótidos restantes. Por ejemplo, un matraz con A dopada daría como resultado 70 % de A, 10 % de C, 10 % de G y 10 % de U. Después de las etapas de desprotección y purificación, se convierten los conjuntos de ADN monocatenario en ADNbc mediante PCR o extensión por cebador. Durante el proceso, se adjunta un promotor T7 al extremo 5' del conjunto, haciendo del ADN bicatenario resultante un sustrato para la ARN polimerasa T7. Pueden generarse entonces conjuntos de ARN o ARN modificado mediante transcripción de desprendimiento. Pueden adquirirse también conjuntos equivalentes de fuentes comerciales tales como Invitrogen (Carlsbad, CA) o Integrated DNA Technologies (Coralville, IA).

**[0065]** En ciertas realizaciones, las moléculas que contienen ARN contienen regiones aleatorias. Las regiones



aleatorias pueden ser de cualquier longitud que permitan en la práctica la síntesis y purificación. En realizaciones particulares, la aleatorización puede estar en el intervalo de 10 posiciones aleatorias (N30) a más de 100 posiciones aleatorias (N100). Las moléculas que contienen ARN contienen también regiones constantes que permiten a los cebadores de PCR unirse para la transcripción. Por esta razón, la relación de longitud aleatoria a longitud constante variará dependiendo de la longitud de la región aleatoria. Es decir, un conjunto de N30 tendrá probablemente casi la misma cantidad de posiciones fijas y regiones aleatorias, mientras que un conjunto de N100 tendrá más posiciones aleatorias respecto a las regiones constantes. En unos pocos casos, se encontraron regiones constantes después de la selección que participaban en la funcionalidad de la especie seleccionada final.

**[0066]** Los conjuntos de moléculas que contienen ARN pueden sintetizarse también con grados variables de aleatorización. Los conjuntos "dopados" se preparan aleatorizando parcialmente las posiciones de una secuencia ya existente. Por ejemplo, la selección de una secuencia que se uniría a transcriptasa inversa de VIH (TI) requeriría obtener el sustrato nativo de TI, aleatorizar parcialmente la secuencia y seleccionar las secuencias que se unen a la TI mejor que su sustrato nativo.

**[0067]** En otras realizaciones, se modifican moléculas que contienen ARN para aumentar la estabilidad. Por ejemplo, las moléculas que contienen ARN pueden modificarse con modificaciones 2'-fluoro en todos los residuos de pirimidina para aumentar la estabilidad frente a la degradación alcalina y las nucleasas de origen natural. Son bien conocidas en la materia otras modificaciones de bases.

**[0068]** Para los procedimientos descritos en la presente memoria, pueden introducirse variaciones en varios puntos diferentes de los procesos. Las moléculas que contienen ARN pueden tener diferentes modificaciones tales como nucleótidos modificados con 2'-fluoro, nucleótidos modificados con 2'-amino, ARN modificados con 2'-O-metilo, ácidos nucleicos con esqueletos peptídicos o combinaciones de las mismas. Además, pueden usarse diferentes disoluciones de nucleasa y las nucleasas pueden incubarse durante periodos diferentes de tiempo.

**[0069]** En un aspecto particular, las moléculas que contienen ARN pueden marcarse detectablemente. Como se usa en la presente memoria, "marcado detectablemente" significa que una molécula que contiene ARN está ligada operativamente con un resto que es detectable. Se indica por "ligado operativamente" que el resto se une a la sonda mediante un enlace covalente o no covalente (por ejemplo, iónico). Los procedimientos para crear enlaces covalentes son conocidos (véanse los protocolos generales, por ejemplo, en Wong, S. S., "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking", CRC Press 1991; Burkhart y col., "The Chemistry and Application of Amino Crosslinking Agents or Aminoplasts", John Wiley & Sons Inc., ciudad de Nueva York, NY, 1999).

**[0070]** Según la invención, un "marcador detectable" es un resto que puede percibirse. Dichos marcadores pueden ser, sin limitación, fluoróforos (por ejemplo, fluoresceína (FITC), ficoeritrina, rodamina), tintes químicos o compuestos que son radiactivos, quimioluminiscentes, magnéticos, paramagnéticos, promagnéticos o enzimas que proporcionan un producto que puede ser coloreado, quimioluminiscente o magnético. La señal es detectable mediante cualquier medio adecuado, incluyendo medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. En ciertos casos, la señal es detectable mediante dos o más medios. En ciertas realizaciones, los marcadores de ácido nucleico incluyen tintes fluorescentes, radiomarcadores y marcadores quimioluminiscentes, que son ejemplos que no pretenden limitar el alcance de la invención (véanse, por ejemplo, Yu, y col., (1994) Nucleic Acids Res. 22 (16): 3226 – 3232; Zhu, y col., (1994) Nucleic Acids Res. 22 (16): 3418 – 3422).

**[0071]** Por ejemplo, los nucleótidos de moléculas que contienen ARN pueden conjugarse con tintes fluorescentes Cy5/Cy3. Estos tintes se usan frecuentemente en la materia (véase, por ejemplo, Yang y col., (2005) Clin. Cancer Res. 11 (2 Pt 1): 612 – 20). Los marcadores fluorescentes pueden seleccionarse de una variedad de clases estructurales, incluyendo ejemplos no limitantes tales como 1- y 2-aminonaftaleno, p,p'-diaminoestilbenos, pirenos, sales cuaternarias de fenantridina, 9-aminoacridinas, p,p'-diaminobenzofenoniminas, antracenos, oxocarbocianina, marocianina, 3-aminoequilenina, perileno, bisbenzoxazol, bis-p-oxazolilbenceno, 1,2-benzofenazina, retinol, sales de bis-3-aminopiridinio, helebrigenina, tetraciclina, esterofenol, bencimidazolilfenilamina, 2-oxo-3-cromeno, indol, xanteno, 7-hidroxicumarina, fenoxazina, salicilato, estrofantidina, porfirinas, triarilmetanos, flavina, tintes de xanteno (por ejemplo, tintes de fluoresceína y rodamina); tintes de cianina; tintes de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno y proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde y fibobiliproteína).

**[0072]** Son otros tintes útiles los tintes quimioluminiscentes y pueden incluir, sin limitación, nucleótidos de ARN conjugados con biotina. El marcaje de ARN puede lograrse mediante cualquier medio conocido en la materia, por ejemplo, el kit de marcaje de ADN de primera hebra CyScribe™ (nº RPN6200, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

**[0073]** Las moléculas que contienen ARN pueden cointernalizar la carga adjuntando la carga a la molécula que contiene ARN. Por ejemplo, el ARNip y otras secuencias de ácido nucleico pueden sintetizarse directamente en el ARN seleccionado, hibridarse con el ARN seleccionado o unirse químicamente usando procedimientos bien conocidos en la materia. Las cargas ejemplares incluyen, pero sin limitación, ARNip y microARN.

**[0074]** En aspectos particulares, se identifica la molécula que contiene ARN que internaliza exitosamente la carga en la célula. En ciertas realizaciones, la molécula que contiene ARN se identifica mediante análisis funcional. Por ejemplo, la molécula que contiene ARN puede suministrar un ARNip que inhibe una ruta particular, que puede identificarse observando el fenotipo afectado por la ruta. Como alternativa, puede analizarse el nivel de expresión del ARNip diana a niveles de proteína o ARN. Por tanto, este procedimiento es útil para el suministro de moléculas de carga a rutas específicas de la célula.

**[0075]** El uso de las palabras “un” o “uno”, cuando se usan junto con el término “comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva, puede significar “uno”, pero es también consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”. El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa para indicar “y/o” a menos que se indique explícitamente para designar alternativas solo o si las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoya la definición que designa alternativas solo e “y/o”. A lo largo de esta solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye una variación inherente del error tal como  $\pm 10\%$ .

**[0076]** Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras “comprender” (y cualquier forma de comprender, tal como “comprendiendo” y “comprende”), “tener” (y cualquier forma de tener, tal como “teniendo” y “tiene”), “incluir” (y cualquier forma de incluir, tal como “incluyendo” e “incluye”) o “contener” (y cualquier forma de contener, tal como “conteniendo” y “contiene”) son inclusivas o de extremos abiertos y no excluyen elementos o etapas de procedimiento adicionales no enumerados.

**[0077]** El término “o combinaciones de los mismos”, como se usa en la presente memoria, designa todas las permutaciones y combinaciones de los puntos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, “A, B, C o combinaciones de los mismos” se pretende que incluya al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Siguiendo con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más puntos o términos tales como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB y demás. El especialista entenderá que no hay típicamente límite al número de puntos o términos en cada combinación, a menos que resulte evidente de otro modo por el contexto.

### Ejemplos

**[0078]** Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deberían considerarse limitantes.

#### Ejemplo 1

##### Secuencias y cebadores

**[0079]** El conjunto N30 usado para estas selecciones tenía la siguiente secuencia:

**5'GGGAATGGATCCACATCTACGAATTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NNTTCACTGCAGACTTGACGAAGCTT 3' (SEQ ID NO.: 1);**

en la que N es cualquiera de las cuatro bases. Se sintetizó el conjunto y se purificó como se describe a continuación. Los cebadores de amplificación para el conjunto N30 fueron los siguientes:

(directo) 41.30: 5'GATAATACGACTCACTATAGGGAATGGATCCACATCTACGA 3' (SEQ ID NO.: 2);  
(inverso) 24.30: 5' AAGCTTCGTCAAGTCTGCAGTGAA 3' (SEQ ID NO.: 3).

**[0080]** El molde para el aptámero anti-PSMA A9 usado en estos ensayos tenía la siguiente secuencia:

**5'GGGAGGACGAUGC GGACCGAAAAGACCUGACUUCUAUACUAAGUCUACGUUC  
CCAGACGACUCGCCCGA 3', (SEQ ID NO.: 4);**

en que las secuencias subrayadas representan las regiones constantes usadas para amplificar el aptámero. Los cebadores de amplificación para A9 fueron los siguientes:

(directo) 5' TTCTAATACGACTCACTAT AGGGAGGACGATGCCGG 3' (SEQ ID NO.: 5);

(inverso) 5' TCGGGCGAGTCGTCTG 3' (SEQ ID NO.: 6);

**[0081]** Todos los cebadores y el molde A9 se solicitaron a IDT (Coralville, IA).

#### Síntesis y purificación del conjunto

5 **[0082]** El conjunto usado en esta selección consistía en 30 residuos aleatorios flanqueados por regiones constantes. El conjunto se sintetizó con un sintetizador ABI Expedite 8909 (Foster City, CA). Las posiciones aleatorias se generaron mezclando las fosforamidas de A, C, G y T a una relación molar de 3: 3: 2: 2,4 de tal modo que la eficacia de acoplamiento de cada base fuera aproximadamente igual, y que la composición final de una posición aleatoria tuviera un 25 % de posibilidades de ser A, C, G o T.

10 **[0083]** Se suspendió la resina en fase sólida de la síntesis en 1 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 30 % durante una noche a 55 °C para desproteger el ADN. Se centrifugó la reacción para sedimentar la resina y se precipitó la capa de  $\text{NH}_4\text{OH}$  que contenía el ADN con 10 ml de n-butanol a 4 °C y 13.000 rpm durante 45 min. Se lavó el sedimento con etanol al 70 % y entonces se secó. Dado que los productos de síntesis abortada están a menudo presentes en largas secuencias, se purificó el ADN en gel en un gel de acrilamida al 10 %/urea 7 M. Se extrajo la banda correspondiente al producto completo del gel, se cortó en fragmentos y se eluyó durante una noche con  $\text{H}_2\text{O}$ . Se precipitó el ADN eluido con etanol al 100 % con glucógeno como portador de precipitación, se lavó con etanol al 70 % y se secó.

15 **[0084]** Después de la desprotección y purificación, se convirtió el conjunto de ADN monocatenario en ADNbc mediante extensión y PCR a gran escala usando los cebadores 41.30 y 24.30. El cebador 41.30 sirvió también como secuencia promotora T7 para las etapas de transcripción posteriores del conjunto. Se mezclaron aproximadamente 2,8 nmol de ADN del conjunto monocatenario con 115 nmol de cebador 24.30 y 0,2 nM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, GE Healthcare, Piscataway, NJ) en un volumen total de 43 ml. Se desnaturizó la muestra a 65 °C durante 5 min y se enfrió entonces a 4 °C. Se añadió una mezcla maestra de KCl 50 mM, Tris-Cl 100 mM (pH = 8,3),  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM y 1,440 U de polimerasa Taq (NEB, Ipswich, MA) en un volumen total de 43,3 ml al conjunto desnaturizado y se incubó a 72 °C durante 1 h. A final de la extensión, se añadieron 115 nmol de 41.30 en un volumen total de 28,7 ml y se cicló la reacción a 94 °C durante 30 s, a 50 °C durante 30 s y a 72 °C durante 1 min durante 8 a 9 ciclos, seguido de una etapa a 72 °C durante 2 min. Se precipitaron los productos de PCR en 2,5x volúmenes de etanol al 100 % a 4 °C durante 45 min, seguido de un lavado con etanol al 70 % y entonces se secó.

20 **[0085]** Se efectuó una transcripción a gran escala para generar el conjunto de ronda 0 de partida en que se añadieron 75  $\mu\text{g}$  de PCR del conjunto a 1,5 ml de mezcla de transcripción de Tris 40 mM (pH = 8,0),  $\text{MgCl}_2$  26 mM, DTT 5 mM, ATP 5 mM, GTP 5 mM, 2'-fluoro-CTP 5 mM, 2'-fluoro-UTP 5 mM, 0,01 U de pirofosfatasa y 75 U de polimerasa Y639F T7. Se estimó que el conjunto N30 tenía una complejidad de aproximadamente  $10^{15}$  secuencias. Por lo tanto, esta cantidad de entrada representaría aproximadamente secuencias de 1,5 genomas. Esta escala da cuenta adecuadamente de cada posible secuencia sintetizada y, por lo tanto, representaba la diversidad máxima.

25 **[0086]** Se dejó procesar la reacción de transcripción durante una noche a 37 °C. Después de la incubación, se añadieron 75 U de ADNasa I (Epicentre, Madison, WI) a la reacción, y se incubó adicionalmente la reacción durante 30 min. Se añadió un volumen igual de 2X tinte desnaturizante (urea 7 M, base Trizma 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 0,5 mM y 0,1 % de azul de bromofenol) y se desnaturizó la reacción a 70 °C durante 3 min antes de purificación en gel como se describe anteriormente.

#### Líneas celulares y cultivo

30 **[0087]** Se obtuvieron células HeLa-CD4 a partir del NIH AIDS Research & Reference Reagent Program (Germantown, MD). Se adquirieron células LnCap en la ATCC (Manassas, VA). Se mantuvieron ambas líneas en RPMI-1640 (ATCC, Manassas, VA) suplementado con 10 % de FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivaron a 37 °C y atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ . Para la tripsinación, se lavaron las células una vez con un volumen de cultivo de DPBS, y entonces se añadió 1/10 de volumen de 0,05 % de tripsina-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA) a las células. Se incubaron las células a 37 °C durante aproximadamente 2 min hasta que las células se despegaron. Se inactivó la tripsina añadiendo medio de cultivo. Todas las etapas de lavado celular usaron PBS a temperatura ambiente. Todas las etapas de centrifugación celular fueron a 4 °C y 1500 rpm durante 5 min.

#### Ensayos de nucleasa

35 **[0088]** Para asegurar que los ARN modificados y células pudieran sobrevivir al protocolo de digestión y selección, se transcribió el conjunto de ADNbc como se describe anteriormente en una reacción a menor escala. Se incluyó GTP marcado con  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$  (Perkin Elmer, Shelton, CT) en la reacción para generar transcritos radiactivos marcados en el cuerpo.

40 **[0089]** Para el ensayo, se tomaron alícuotas de aproximadamente  $4 \times 10^6$  células HeLa-CD4 en cada tubo y se centrifugaron a 1500 rpm a 4 °C durante 5 min. Después de lavar una vez con 500  $\mu\text{l}$  de PBS, se resuspendió cada tubo de células en 85  $\mu\text{l}$  de ARN y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadieron diferentes cantidades de Riboshredder o ARNasa T1 y se incubaron las células durante otros 30 min. Se centrifugaron las células y se procesó el ARN recuperado en un gel de acrilamida al 8 % con 1X TBE y urea 7 M. Se secó el gel sobre

papel de filtro (Whatman, Florham Park, NJ) y se expuso durante una noche a una pantalla Phosphorimager para examen.

**[0090]** Para determinar que las células no se afectaban adversamente por las etapas de lavado, incubación o aplicación de nucleasa, se realizaron repeticiones de estos ensayos de digestión de nucleasa, se contaron las células y se tomaron alícuotas en tubos separados. A diferentes intervalos, se mezclaron células de cada tubo y se contaron de nuevo. No se observaron problemas de salud celular significativos.

#### Ensayo de internalización

**[0091]** Se efectuaron ensayos de internalización usando un aptámero de superficie celular, el aptámero anti-PSMA A9 (Lupold y col., (2002) *Cancer Res.* 62 (14): 4029-33). Se transcribió A9 desde un molde oligonucleotídico usando una versión a escala reducida de la transcripción de conjunto expuesta anteriormente en "Síntesis y purificación del conjunto".

**[0092]** Tres días antes del ensayo, se sembraron  $1 \times 10^5$  células LnCap en una placa de 24 pocillos. Después de establecerse las células, se lavaron las células y se añadió medio reciente. Después de equilibrar durante 1 hora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, se trataron las células con una de cuatro condiciones. En la muestra "ARN", se añadió directamente A9 50 nM al medio en células durante 45 min. En la muestra "az-dG", se trataron primero las células durante 10 min con azida de sodio 10 mM y desoxiglucosa 50 mM para evitar la endocitosis, y se añadió entonces ARN al medio después de lavar con 250 µl de DPBS. En la muestra "Rb", se incubó ARN en células y se lavaron entonces las células con 250 µl de DPBS antes del tratamiento de nucleasa con 0,02 U/µl de Riboshredder (Epicentre, Madison, WI) durante 15 min para digerir las uniones. Finalmente, en la muestra "az-dG/Rb", se trataron las células con az-dG antes de añadir ARN, y se trataron las células con nucleasa después de la digestión de ARN. Después de la digestión de ARN, se incubaron aquellas muestras tratadas con az-dG también en bloques enfriados con hielo para detener otros mecanismos de internalización. Se efectuó cada tratamiento por triplicado.

**[0093]** Después del tratamiento, se lavaron todas las muestras con 500 µl de DPBS y se extrajo el ARN total celular de cada muestra con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando tubos Phase Lock según los protocolos del fabricante (Eppendorf, Westbury, NY). La cuantificación de los ARN mostró cantidades similares de ARN recuperado (datos no mostrados), sugiriendo que ninguno de los tratamientos variaba significativamente el contenido. Se transcribió inversamente el ARN extraído total con cebadores específicos de aptámero en reacciones a escala reducida semejantes a las descritas en "Síntesis y purificación del conjunto" y se ensayaron mediante PCR instantánea.

**[0094]** Para la PCR instantánea, se mezclaron psm5 y psm3 600 nM con 12,5 µl de 2X SybrMix y 10 µl de una dilución 1: 10 de cada una de las reacciones de TI. Se cargaron las muestras en un dispositivo instantáneo ABI 7300 y se ciclaron como sigue: 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min. Después de la ciclación, se incluyó una etapa de disociación para comprobar la integridad de los productos como sigue: 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 30 s y 95 °C durante 15 s. Se determinó la comparando la CT de cada muestra con un control celular no tratado.

#### Selección de internalización

**[0095]** Un día antes de la ronda de selección, se sembraron  $4 \times 10^5$  células HeLa-CD4 sobre dos placas de cultivo de tejido de 60 mm. Una hora antes de cada ronda de selección, se reemplazó el medio de cultivo por medio reciente. Para la primera ronda de selección, se añadieron 54 µg de ARN de conjunto modificado (1,2 mM), que representan aproximadamente 1 genoma del conjunto, a una de las dos placas. Después de incubar durante 3 días, se tripsinizaron las células, se lavaron dos veces con DPBS (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se extrajo el ARN celular total de ambas placas usando 1 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y tubos Phase Lock siguiendo las instrucciones del fabricante (Eppendorf, Westbury, NY).

**[0096]** Se transcribió inversamente el ARN celular total recuperado como sigue: se desnaturalizó una reacción que contenía 84 µg de ARN extraído total y cebador inverso 24.30 10 µM en 1X tampón de TI (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 70 °C durante 5 min y se enfrió entonces lentamente a temperatura ambiente. Se añadió una mezcla maestra de DTT 10 mM, 1 mM de cada dNTP y 28 U de transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA) a la mezcla y se incubó a 50 °C durante 1 h. Se efectuaron también controles sin TI a menor escala de ambas células expuestas al conjunto y no expuestas para confirmar que cualquier producto recuperado era ARN del conjunto inicial y no un artefacto celular o molde de ADN transferido.

**[0097]** Se usó la mitad de la reacción de TI para sembrar la PCR a gran escala para la siguiente ronda. Se regeneró cada conjunto de ronda según el protocolo expuesto en "Síntesis y purificación del conjunto" con modificaciones para ajustarse a la escala reducida de ácido nucleico de cada ronda. En rondas posteriores, se descubrió también que las concentraciones de cebador usadas en la amplificación de conjunto original estaban en gran exceso, y se redujeron las concentraciones de cebadores de PCR a 0,4 mM de cada cebador.

**[0098]** Se efectuaron las rondas de selección con cada vez menos ARN de entrada, tiempos de incubación más cortos y más etapas de lavado. Se determinó la progresión de la selección evaluando el número de ciclos de PCR necesarios antes de que pudiera observarse un producto de amplificación. Esto está directamente correlacionado con la cantidad de material de entrada, en este caso, cuánto ARN del conjunto se recuperaba probablemente durante esa ronda de selección. Se observó una caída drástica en el ciclo # después de la ronda 3 (la primera ronda en reducir significativamente la cantidad de conjunto puesto en las células) y después de la ronda 5, cuando se usó un lote reciente de células. Después de la ronda 9, las PCR no parecieron mejorar en el número de ciclos, y se consideró acabada la selección.

## **Ejemplo 2**

### 1. Identificación de moléculas que contienen ARN

**[0099]** Se usó una secuencia de ARN internalizante, el aptámero anti-PSMA A9, para ensayar las condiciones novedosas dadas a conocer en la presente memoria, y para identificar las moléculas que contienen ARN y asegurar la supervivencia de las internalizadas.

**[0100]** La Figura 1 muestra la eficacia de las condiciones de aplicación de nucleasa. Se trataron aproximadamente  $10^6$  células LnCap con una de cuatro condiciones: se añadió directamente aptámero anti-PSMA a medio en células (ARN); se trataron primero las células durante 10 minutos con azida de sodio 10 mM y desoxiglucosa 50 mM para evitar la endocitosis, y se añadió entonces ARN al medio después de lavar (az-dG); se añadió ARN a células y se trataron entonces las células con nucleasa con 0,02 U/ $\mu$ l de Riboshredder (Epicentre) para digerir las uniones (Rb); o se trataron las células con az-dG antes de añadir el ARN, y se trataron las células con nucleasa después de la digestión del ARN. Se realizó cada tratamiento por triplicado. Se transcribió inversamente el ARN celular total de cada uno de los tratamientos con cebadores específicos de aptámero, y se determinaron los ciclos de PCR instantánea respecto a los niveles de GAPDH. El tratamiento con az-dG redujo la señal  $\Delta$ CT ligeramente, mientras que el tratamiento con Rb redujo la señal drásticamente, indicando que mucho del aptámero permanecía extracelular, pero parte estaba protegido. El tratamiento con az-dG y Rb anuló completamente la señal; la señal del tratamiento con Rb era debida a aptámero internalizado.

### 2. Selección

**[0101]** Se usó un conjunto de ARN modificado con 2'-fluoro dopado basado en el aptámero A9, en el que cada posición de base en el aptámero estaba dopada aproximadamente un 30 %, para ensayar el esquema de selección propuesto en la presente memoria. Se añadieron de 3 a 5  $\mu$ g de conjunto de PSMA dopado a células LnCap a 70-80 % de confluencia en un matraz T25, y se incubaron las células durante una noche. Se lavaron entonces las células con PBS y se trataron con 0,01 U/ $\mu$ l de Riboshredder en PBS durante 10 min. Se lavaron entonces las células tres veces y se extrajo el ARN celular total con 1 ml de Trizol. Se transcribió inversamente el ARN recuperado y se amplificó mediante PCR para generar un molde para la transcripción de la siguiente ronda.

**[0102]** Después de cinco rondas de selección, se ensayó en las rondas su capacidad de internalizar conjugados de estreptavidina/biotina cargados con anti-lamina A/C-ARNip, como se efectuó anteriormente con el aptámero A9 mismo (Chu y col., (2006) *Nucleic Acids Res.* 34 (10): e73). Un ARNip anti-eGFP sirvió como control negativo (Figura 3). Se amplificaron cinco clones del conjunto de ronda 5, se secuenciaron y se ensayó la internalización de lamina A/C-ARNip. Los 5 clones (p1, p2, p6 – 8) demostraron reducción de la expresión de lamina A/C normalizada respecto a GAPDH y control celular, indicando su capacidad de entrar en células independientemente de cualquier procedimiento de transfección. Los conjugados de ARNip sin A9 o los clones no demostraron silenciamiento génico de lamina A/C. Tres de los cinco clones (p1, p7, p8) mostraron un silenciamiento génico ligeramente mejor de lamina A/C en comparación con el aptámero A9 de tipo silvestre (Figura 4).

**[0103]** Selecciones de internalizados de un conjunto aleatorio de ácidos nucleicos. Para la selección inicial, se usó un conjunto de ARN modificados con 2'-fluoro con una región aleatoria de 30 bases para seleccionar secuencias que se internalizarían en células HeLa-CD4. La etapa de nucleasa no se incluyó en las dos primeras rondas. Para las rondas 1-6, se incubó el conjunto de ARN en células durante 1 día. Periódicamente, se extrajeron con Trizol las células tratadas con conjunto y se transcribió inversamente el ARN total y se amplificó en reacciones de PCR instantáneas para comprobar la presencia de ARN de conjunto en las células. Después de la ronda 6, la señal de amplificación pareció llegar al máximo (véase la Figura 5). Se llevó a cabo una ronda más con incubación de 1 día y entonces las rondas posteriores se incubaron en células solo durante 1 hora. La ronda 9 no mejoró significativamente. Se aislaron los clones de la ronda 9 y se ensayó su capacidad de transportar ARNip en células. La Tabla 1 resume las diversas rondas de selección.

Tabla 1

| Ronda          | 1       | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|----------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ARN de entrada | 57,5 µg | 20 µg | 20 µg | 10 µg | 10 µg | 10 µg |
| Incubación     | 3 días  | 1 día | 1 día | 1 día | 1 día | 1 día |
| ARNasa         | No      | Sí    | *     | Sí    | Sí    | Sí    |
| Ciclos         | 15      | 15    | 26    | 26    | 12    | 18    |

\*Las rondas 1 y 2 usaron más entrada en las PCR

### Ejemplo 3

5

#### 1. Identificación de moléculas que contienen ARN

**[0104]** Se usa una secuencia de ARN internalizante, el aptámero anti-PSMA A9, para ensayar el procedimiento de reducción iterativa del periodo de tiempo en que se ponen en contacto las células con una molécula que contiene ARN. Las condiciones y reactivos son idénticos a los descritos anteriormente.

10

#### 2. Selección

**[0105]** Las condiciones de selección son sustancialmente similares a las dadas a conocer anteriormente. Brevemente, se usa un conjunto de ARN modificado con 2'-fluoro dopado basado en el aptámero A9, en el que cada posición de base del aptámero está dopada aproximadamente un 30 %, para ensayar el esquema de selección propuesto en la presente memoria. Se añaden de 3 a 5 µg de conjunto de PSMA dopado a células LnCap a 70 – 80 % de confluencia en un matraz T25 y se incuban las células durante una noche. Se lavan entonces las células con PBS y se tratan con 0,01 U/µl de Riboshredder en PBS durante 14 min. Se lavan las células tres veces y se extrae el ARN celular total con 1 ml de Trizol. Se transcribe inversamente el ARN recuperado y se amplifica mediante PCR para generar moldes para la transcripción de la siguiente ronda.

15

20

**[0106]** Se incubaba entonces el ARN recuperado usando el mismo procedimiento que anteriormente, con la excepción de que el periodo de incubación se reduce a 12 horas. Se incubaba el ARN recuperado de la segunda ronda de selección durante 10 horas, siendo los demás lavados y condiciones idénticos a la primera ronda. La ronda 4 tiene un periodo de incubación de 8 horas, la ronda 5 tiene un periodo de incubación de 4 horas, la ronda 6 tiene un periodo de incubación de 2 horas y las rondas 7 a 9 tienen un periodo de 1 hora. Después de las cinco primeras rondas de selección, se ensaya en las rondas su capacidad de internalizar conjugados de estreptavidina/biotina cargados con anti-lamina A/C-ARNip, como se efectuó anteriormente con el aptámero A9 mismo (Chu y col., (2006) Nucleic Acids Res. 34 (10): e73). Un ARNip anti-eGFP sirve como control negativo. Se amplifican los clones del conjunto de la ronda 9, se secuencian y se ensaya la internalización de lamina A/C-ARNip. Los clones demuestran reducción de la expresión de lamina A/C normalizada respecto a GAPDH y células de control que no se exponen a ARNip. Esto indica su capacidad de entrar en células independientemente de cualquier procedimiento de transfección. Los conjugados de ARNip sin A9 o los clones no demuestran silenciamiento génico de lamina A/C. Los clones identificados de rondas posteriores de incubación muestran también una internalización más rápida que los clones identificados en la ronda 1, indicando que los clones de rondas posteriores de selección se internalizan más rápidamente.

25

30

35

#### LISTADO DE SECUENCIAS

40

#### [0107]

< 110 > Board of Regents, The University of Texas System Andrew, Ellington Levy, Matthew Yan, Amy Chu, Chi - Tai  
 45 < 120 > PROCEDIMIENTO DE SELECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS INTERNALIZANTES EN CÉLULAS  
 < 130 > UTAU: 2108  
 < 150 > US 60/910.792  
 < 151 > 09-04-2007  
 < 160 > 6  
 50 < 170 > PatentIn versión 3. 4  
 < 210 > 1  
 < 211 > 80  
 < 212 > ADN  
 < 213 > Artificial  
 55 < 220 >  
 < 223 > Oligonucleótidos sintetizados químicamente  
 < 220 >  
 < 221 > msc\_feature



**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para seleccionar moléculas que contienen ARN internalizables que comprende:
  - 5 a) poner en contacto una o más células con una colección de ácidos nucleicos aleatorios de moléculas que contienen ARN, comprendiendo las moléculas que contienen ARN ácidos nucleicos estabilizados y conteniendo regiones de secuencia constante;
  - b) lavar las células;
  - 10 c) exponer las células a una o más nucleasas, en las que la una o más nucleasas son ARNasas o ribonucleasas;
  - d) extraer los ácidos ribonucleicos totales de las células;
  - 15 e) multiplicar los ácidos ribonucleicos internalizados; y
  - f) repetir las etapas de selección a) - e).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se repite el procedimiento de selección usando las moléculas que contienen ARN identificadas en la ronda 1 de selección.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se selecciona una molécula que contiene ARN internalizable usando dos o más rondas del procedimiento de selección.
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que las una o más células se ponen en contacto con las moléculas que contienen ARN durante periodos decrecientes de tiempo en cada ronda posterior de selección.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la una o más células se ponen en contacto con las moléculas que contienen ARN internalizables durante menos de 24 horas, menos de 10 horas, menos de 5 horas, menos de 2 horas, menos de 1 hora, menos de 30 minutos, menos de 20 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos, menos de 2 minutos, menos de 1 minuto o menos de 30 segundos.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente aislar moléculas que contienen ARN internalizables mediante múltiples rondas de selección, en que cada ronda posterior de selección implica exponer la molécula que contiene ARN internalizable de una ronda anterior de selección a las células durante un periodo reducido de tiempo en comparación con la ronda anterior de selección.
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la colección contiene ARN funcionales de un conjunto de secuencias aleatorizadas.
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ARN comprende al menos una secuencia aleatoria y al menos una secuencia constante.
9. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la una o más células se ponen en contacto con menos entrada de moléculas que contienen ARN en cada ronda posterior de selección.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las moléculas que contienen ARN se seleccionan para internalización en células que expresan el receptor CD4.
- 50 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que las moléculas que contienen ARN están ligadas con ARNip, toxinas, miARN, aptámeros o moléculas pequeñas.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las moléculas que contienen ARN son al menos parcialmente resistentes a nucleasa.
- 55 13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ARN comprende dos o más secuencias constantes.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la secuencia aleatoria comprende al menos 10 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos, al menos 40 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos, al menos 60 nucleótidos, al menos 70 nucleótidos, al menos 80 nucleótidos, al menos 90 nucleótidos o más de 100 nucleótidos.
- 60 15. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de tratar las células para evitar la endocitosis activa.
- 65



16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las moléculas que contienen ARN están marcadas detectablemente.

5 17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células se fijan antes del contacto con la colección de moléculas que contienen ARN.

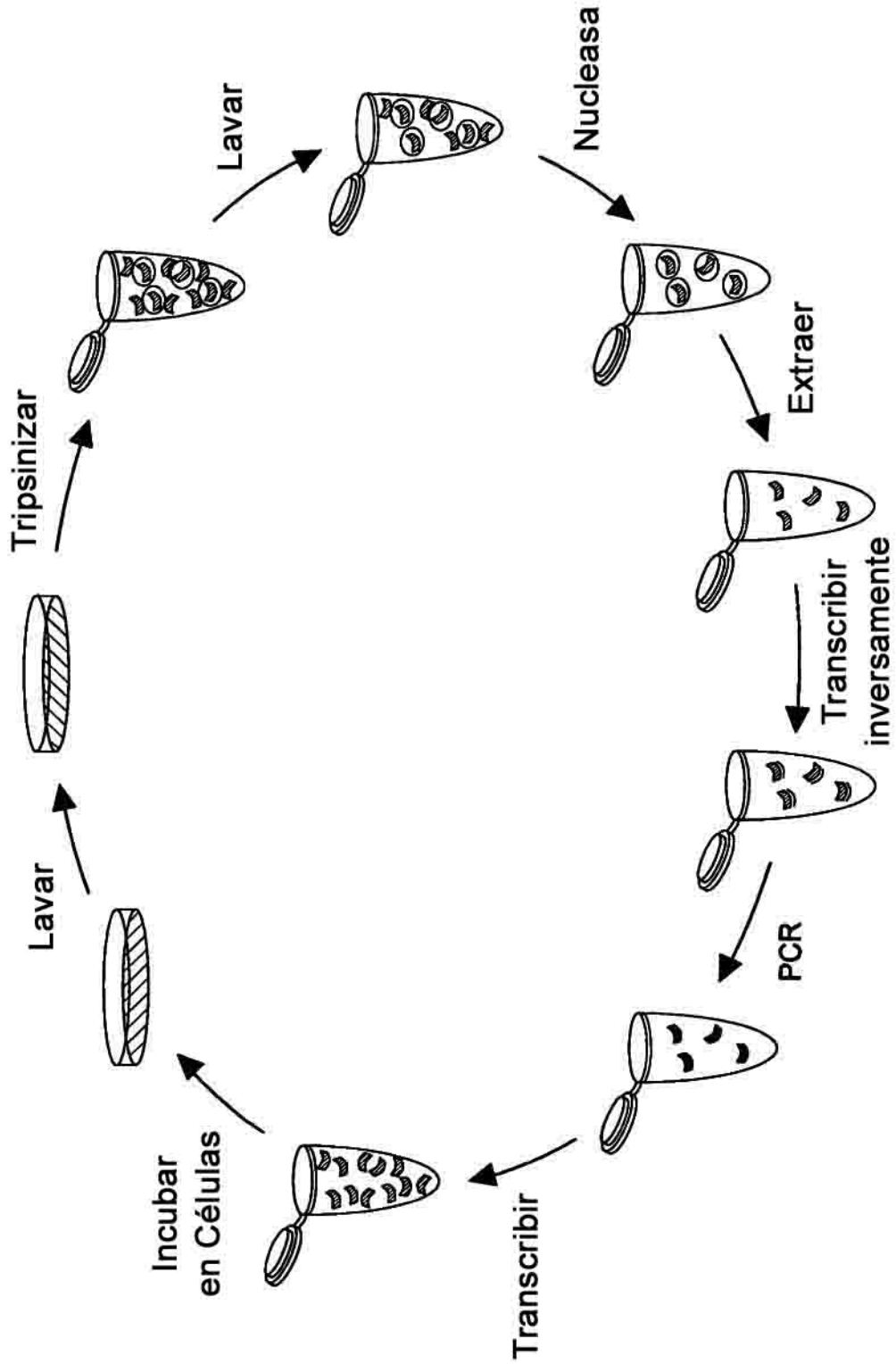


FIG. 1

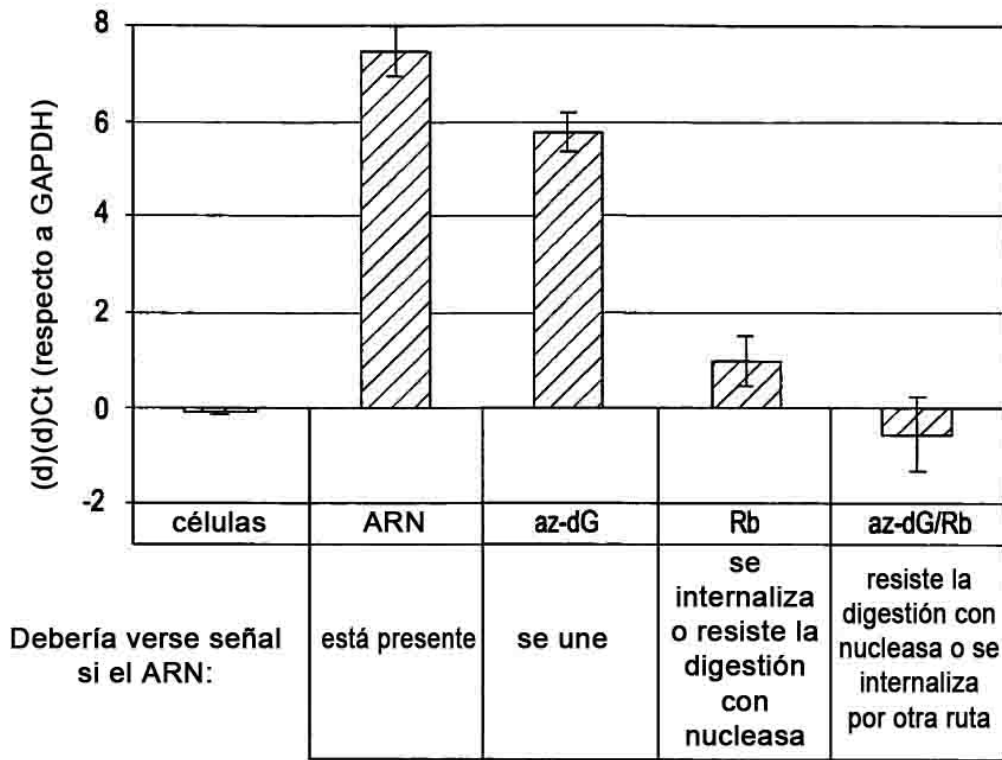


FIG. 2

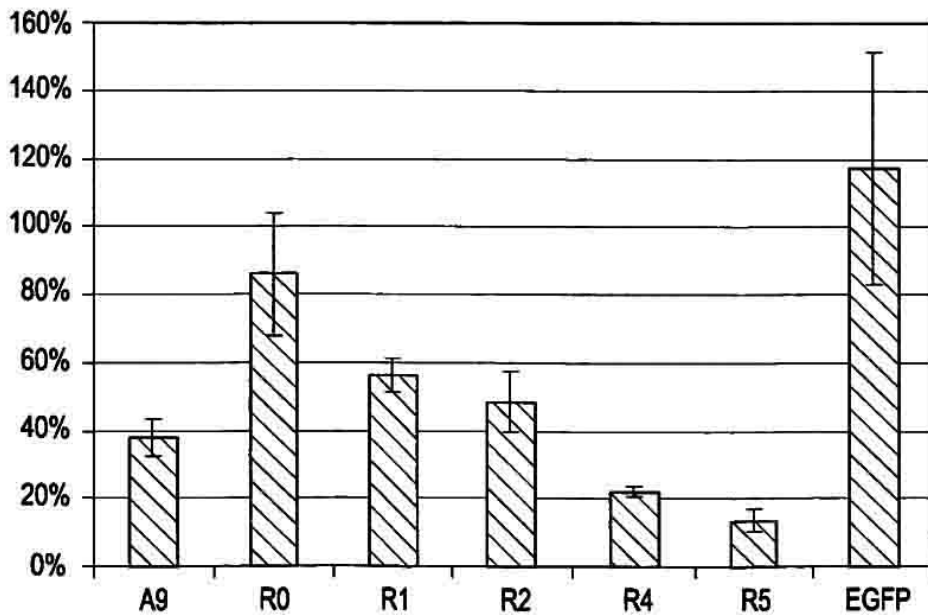


FIG. 3

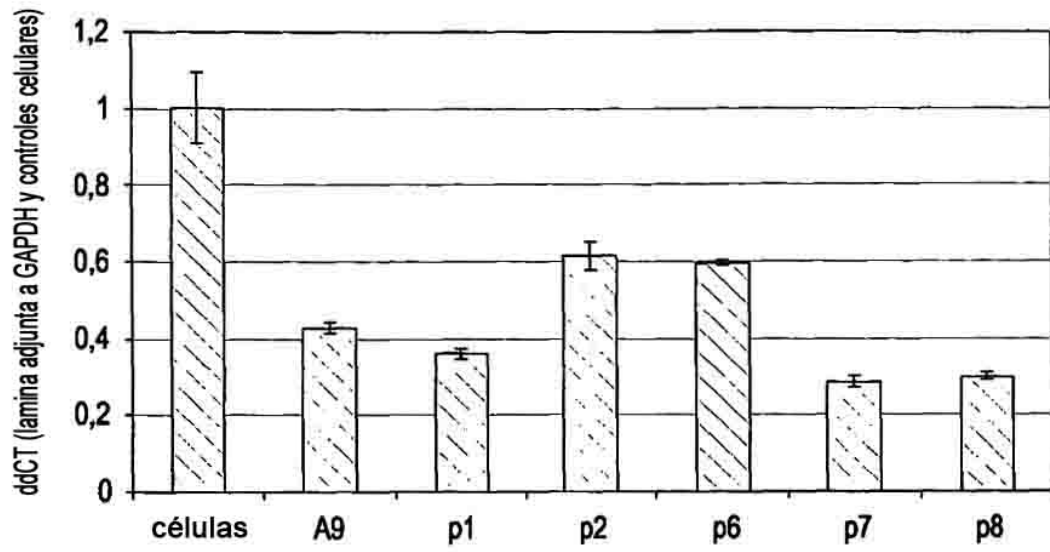


FIG. 4

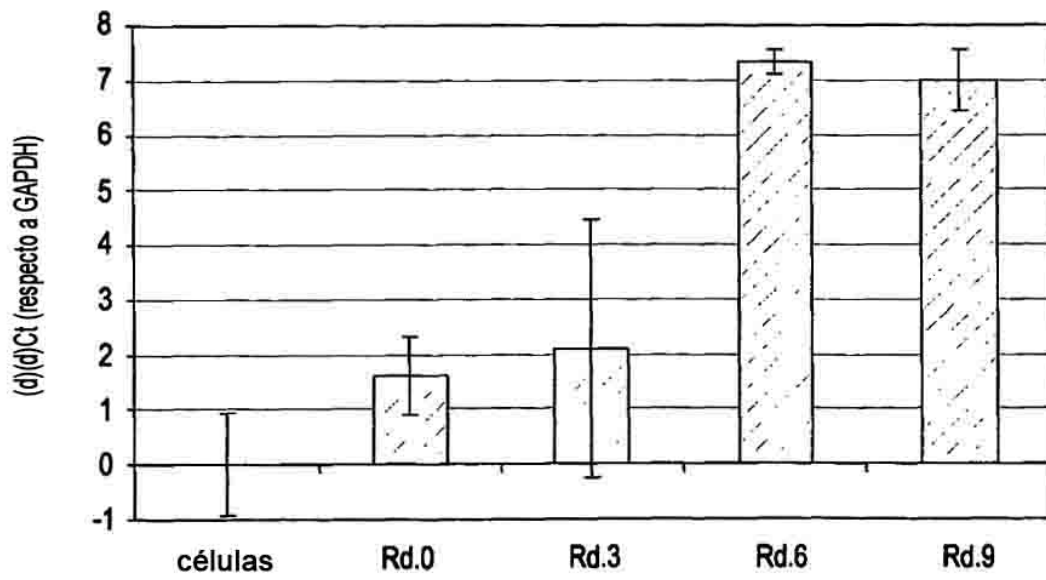


FIG. 5