

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 791**

51 Int. Cl.:

C07H 21/02 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 15/115 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2004 E 04760163 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 1620547**

54 Título: **Aptámeros estabilizados para factor de crecimiento derivado de plaquetas y su uso como productos terapéuticos oncológicos**

30 Prioridad:

21.04.2003 US 464239 P	21.04.2003 US 464179 P
23.04.2003 US 465055 P	23.04.2003 US 465053 P
08.05.2003 US 469628 P	29.05.2003 US 474133 P
29.05.2003 US 474680 P	11.07.2003 US 486580 P
23.07.2003 US 489810 P	29.07.2003 US 491019 P
16.09.2003 US 503596 P	17.10.2003 US 512071 P
21.11.2003 US 718833	21.11.2003 US 523935 P
16.01.2004 US 537045 P	16.01.2004 US 537201 P
21.01.2004 US 762915	15.04.2004 US 826077

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.10.2014

73 Titular/es:

ARCHEMIX LLC (100.0%)
601 Montgomery Street, Suite 2020
San Francisco, CA 94111, US

72 Inventor/es:

EPSTEIN, DAVID;
STANTON, MARTIN;
DESOUZA, ERROL;
WILSON, CHARLES;
GRATE, DILARA;
MCCAULEY, THOMAS y
DIENER, JOHN L.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 502 791 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 productos terapéuticos oncológicos

5

Campo de la invención

La invención se refiere en general al campo de los ácidos nucleicos y más particularmente a aptámeros capaces de unirse con el factor de crecimiento derivado de plaquetas ("PDGF") útiles como productos terapéuticos en oncología y/u otras enfermedades o trastornos en los que se ha implicado al PDGF. La invención se refiere además a materiales y métodos para la administración de aptámeros capaces de unirse con el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

10

Antecedentes de la invención

15

Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que tienen afinidad de unión específica con moléculas mediante interacciones distintas de la formación de pares de bases de Watson-Crick clásica.

20

25

Los aptámeros, como los péptidos generados por presentación de fagos o anticuerpos monoclonales (MAb), son capaces de unirse específicamente con dianas seleccionadas y, mediante la unión, bloquear la capacidad de sus dianas para actuar. Creados por un proceso de selección *in vitro* de grupos de oligonucleótidos de secuencia aleatoria (Figura 1), se han generado aptámeros para más de 100 proteínas incluyendo factores de crecimiento, factores de transcripción, enzimas, inmunoglobulinas y receptores. Un aptámero típico es de 10-15 kDa de tamaño (30-45 nucleótidos), se une con su diana con afinidad subnanomolar, y diferencia frente a dianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, normalmente no se unirán con otras proteínas de la misma familia génica). Varios estudios estructurales han mostrado que los aptámeros son capaces de usar los mismos tipos de interacciones de unión (enlaces de hidrógeno, complementariedad electrostática, contactos hidrófobos, exclusión estérica, etc.) que conducen la afinidad y especificidad en complejos de anticuerpo-antígeno.

30

Los aptámeros tienen varias características deseables para su uso como productos terapéuticos (y de diagnóstico) incluyendo alta especificidad y afinidad, eficacia biológica y excelentes propiedades farmacocinéticas. Además, ofrecen ventajas competitivas específicas frente a anticuerpos y otros productos biológicos proteicos, por ejemplo:

35

1) Velocidad y control. Se producen aptámeros por un proceso completamente *in vitro*, permitiendo la rápida generación de candidatos iniciales (terapéuticos). La selección *in vitro* permite que la especificidad y afinidad del aptámero estén estrechamente controladas y permite la generación de candidatos frente a dianas tanto tóxicas como no inmunogénicas.

40

45

2) Toxicidad e inmunogenicidad. Los aptámeros como clase han demostrado poca o ninguna toxicidad o inmunogenicidad. En dosificación crónica de ratas o marmotas con altos niveles de aptámero (10 mg/kg diario durante 90 días), no se observa toxicidad por ninguna medida clínica, celular o bioquímica. Mientras que la eficacia de muchos anticuerpos monoclonales puede limitarse gravemente por la respuesta inmunitaria a los anticuerpos en sí mismos, es extremadamente difícil inducir anticuerpos para aptámeros (más probablemente porque los aptámeros no pueden presentarse por linfocitos T mediante el MHC y la respuesta inmunitaria se entrena en general para no reconocer fragmentos de ácido nucleico).

50

55

3) Administración. Mientras que todos los productos terapéuticos de anticuerpo aprobados en la actualidad se administran por infusión intravenosa (normalmente durante 2-4 horas), los aptámeros pueden administrarse por inyección subcutánea. Esta diferencia se debe principalmente a la solubilidad comparativamente baja y por lo tanto grandes volúmenes necesarios para la mayoría de los MAb terapéuticos. Con buena solubilidad (> 150 mg/ml) y peso molecular comparativamente bajo (aptámero: 10-50 kDa; anticuerpo: 150 kDa), puede suministrarse una dosis semanal de aptámero por inyección en un volumen de menos de 0,5 ml. La biodisponibilidad de aptámeros mediante administración subcutánea es mayor > 80 % en estudios de monos (Tucker *et al.*, J. Chromatography B. 732: 203-212, 1999). Además, el pequeño tamaño de los aptámeros les permite penetrar en áreas de constricciones conformacionales que no permiten que penetren anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, presentando otra ventaja más de los productos terapéuticos o profilaxis basados en aptámeros.

60

65

4) Cambio de escala y coste. Los aptámeros terapéuticos se sintetizan químicamente y en consecuencia pueden aumentarse de escala fácilmente según sea necesario para cumplir la demanda de la producción. Mientras que las dificultades en el cambio de escala de la producción limitan en la actualidad la disponibilidad de algunos productos biológicos y el coste de capital de una planta de producción de proteínas a gran escala es enorme, un único sintetizador a gran escala puede producir más de 100 kg de oligonucleótido al año y requiere una inversión inicial relativamente modesta. El coste actual de los productos para síntesis de aptámeros en la escala de kilogramos se estima en 500 \$/g, comparable al de anticuerpos altamente optimizados. Se espera que mejoras continuadas en el desarrollo del proceso reduzcan el coste de los productos a < 100 \$/g en cinco años.

5) **Estabilidad.** Los aptámeros terapéuticos son químicamente robustos. Están adaptados de forma intrínseca para recuperar la actividad después de exposición al calor, desnaturalizantes, etc. y pueden almacenarse durante periodos prolongados (> 1 año) a temperatura ambiente como polvos liofilizados. Por el contrario, los anticuerpos deben almacenarse refrigerados.

Presión de líquido intersticial

Los tres tipos más comunes de tratamiento de cáncer son retirada quirúrgica del tejido canceroso, radioterapia para destruir el tejido canceroso y quimioterapia. Estos tratamientos se dirigen a la retirada de los tejidos o células cancerosas o su destrucción en el cuerpo con productos terapéuticos u otros agentes. La quimioterapia sigue siendo una modalidad de tratamiento importante para tumores sólidos. Para reducir potencialmente los efectos secundarios tóxicos y conseguir mayor eficacia de los fármacos quimioterapéuticos, son altamente deseables estrategias para mejorar la distribución de fármacos entre tejidos normales y tumores.

Un obstáculo importante en el tratamiento de tumores sólidos es la captación limitada de agentes terapéuticos en tejido tumoral. La presión de líquido intersticial elevada ("IFP") es una de las propiedades fisiológicamente distintivas de los tumores sólidos que difieren del tejido conectivo sano y se considera que es el principal obstáculo que limita la difusión libre de productos terapéuticos en tumores sólidos. Se han implicado los receptores de PDGF, particularmente PDGF-β, en la regulación de la IFP. A medida que un tumor entra en un estado hiperproliferativo, la sangre que aporta oxígeno y otros nutrientes no puede cumplir los requisitos de los tumores y se produce un estado de hipoxia. La hipoxia desencadena un "cambio angiogénico" que regulará positivamente la expresión de varios factores incluyendo VEGF y PDGF que a su vez actúan para iniciar la angiogénesis. Sin embargo, la angiogénesis que resulta forma una vasculatura tumoral anómala. La vasculatura tumoral se altera hasta el punto de ser incapaz de drenar adecuadamente el exceso de líquido del intersticio y la acumulación de líquido dilata la matriz intersticial elástica provocando el aumento de la presión. Cuando la presión excede la resistencia de la pared capilar, se produce compresión y aumenta la resistencia del flujo sanguíneo.

Esta propiedad de la mayoría de los tumores sólidos, hipertensión intersticial tumoral o IFP aumentada, se ha sugerido como una diana potencial para intentos de aumentar la captación farmacológica del tumor (Jain *et al.*, (1987) *Cancer Res.*, 47: 3039-3051). La IFP aumentada actúa como una barrera para el transporte transvascular tumoral (Jain *et al.* (1997), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26: 71-90). Se ha mostrado que la reducción de la IFP tumoral, o modulación de la presión microvascular, aumenta el transporte transvascular de anticuerpos que se dirigen a tumores o compuestos indicadores de bajo peso molecular (Pietras *et al.*, (2001), *Cancer Res.*, 61, 2929-2934). La etiología de la hipertensión intersticial en tumores no se entiende bien. Una teoría propuesta es que la falta de vasos linfáticos en tumores es un factor que contribuye a la IFP tumoral aumentada (Jain *et al.*, (1987), *Cancer Res.*, 47: 3039-3051). Otra teoría propuesta es que la microvasculatura y el compartimento de estroma de apoyo probablemente sean determinantes importantes para la IFP tumoral (Pietras *et al.*, (2002) *Cancer Res.*, 62: 5476-5484). Las pruebas crecientes apuntan a la tirosina quinasa receptora PDGF β transmembrana como una diana potencial para productos terapéuticos farmacológicos para modular la hipertensión intersticial tumoral. Entre otras dianas potenciales están los factores de crecimiento que se unen con el receptor PDGF β.

Cáncer mediado por PDGF

Además de la IFP y la dificultad de penetrar en los tumores con productos terapéuticos, otro obstáculo en el tratamiento del cáncer son mutaciones en ciertas formas de cáncer por cáncer mediado por PDGF que conduce a expresión constitutiva de PDGF. Estas mutaciones conducen la proliferación anómala de células que da como resultado las diversas formas de cáncer como se muestra en la Figura 3 (Pietras *et al.*, (2001), *Cancer Res.*, 61, 2929-2934). Una mutación génica da como resultado la amplificación de receptores PDGF α en glioblastomas de grado alto. En leucemia mielomonocítica crónica (CMML), la activación constitutiva de receptores PDGF β resulta de una mutación que provoca la fusión de receptores β con proteínas distintas de PDGF (Golub *et al.*, (1994) *Cell* 77, 307-316, Magnusson *et al.*, (2001) *Blood* 100, 623-626). También se ha identificado activación constitutiva del receptor PDGF α debido a mutaciones puntuales activadoras en pacientes con tumores del estroma gastrointestinal (GIST) (Heinreich *et al.*, (2003) *Science* 299, 708-710). El dermatofibrosarcoma protuberante (DFSP) está asociado con la producción constitutiva de proteínas de fusión que se procesan a PDGF-BB (O'Brian *et al.*, (1998) *Gene Chrom. Cancer* 23, 187-193; Shimizu *et al.* (1999) *Cancer Res.* 59, 3719-3723; Simon *et al.* (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 positiva en sarcomas y gliomas de tejido blando (Ostman y Heldin, (2001), *Adv. Cancer Res.* 80, 1-38).

PDGF

Los factores de crecimiento son sustancias que tienen un efecto proliferativo celular en células o tejidos. Cualquier factor de crecimiento dado puede tener más de un receptor o inducir la proliferación celular en más de una línea celular o tejido. El PDGF pertenece a la familia del factor de crecimiento de nudos de cisteína y se aisló originalmente de plaquetas para promover la actividad migratoria y mitogénica celular. El PDGF es un fuerte mitógeno y tiene un papel principal en la regulación de la proliferación de células normales tales como fibroblastos,

células del músculo liso, células neurogliales y células del tejido conectivo. Además, el PDGF media en el crecimiento de células patológicas tal como en trastornos proliferativos, y también desempeña un papel en la angiogénesis. Otro factor de crecimiento implicado en la angiogénesis tumoral es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Se han identificado cuatro cadenas polipeptídicas de PDGF que se sabe actualmente que componen cinco isoformas de PDGF diméricas: PDGF-AA, -BB, -CC, -DD y -AB. Las especies más abundantes son PDGF AB y BB. Las isoformas de PDGF se unen con tirosinas quinasa receptoras α y β . Los receptores de PDGF se expresan por muchos tipos celulares diferentes dentro de los tumores. La unión de isoformas de PDGF con sus receptores afines induce la dimerización y posterior fosforilación de restos específicos en el dominio de tirosina quinasa intracelular de los receptores y activación de la ruta de señalización. Las isoformas de PDGF -AA, -BB, -CC y -AB inducen dimerización del receptor PDGF α . PDGF-BB y PDGF-DD activan la dimerización del receptor PDGF β . Todas las isoformas de PDGF excepto PDGF-AA activan los receptores tanto α como β en células que coexpresan ambos tipos de receptores (Figura 2). Debido a que son potentes mitógenos, las isoformas de PDGF se han marcado como objetivo para el desarrollo de productos terapéuticos de enfermedades proliferativas, tales como cáncer, retinopatía diabética, glomerulonefritis y reestenosis.

El PDGF, que se secreta por células endoteliales, actúa como un mitógeno directo para fibroblastos, recluta pericitos y estimula células de músculo liso vascular. Muchos tumores sólidos presentan señalización paracrina de PDGF en el estroma tumoral. Se sabe que el PDGF regula positivamente 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 conectivo, ECM y sistemas de filamentos de actina intracelulares provocan aumento de la fuerza tensil que contribuye a alta IFP. La alta IFP se localiza en el sitio del tumor y se asocia con mal pronóstico en cánceres humanos ya que aumenta con el tamaño del tumor y la gravedad y el grado del tumor maligno. El papel de la señalización de PDGF en el control de IFP y la expresión regulada positivamente en diversos tumores sólidos, ha impulsado a la investigación sobre si la inhibición de la señalización de PDGF puede reducir la IFP y de este modo aumentar la captación de fármacos en tumores sólidos. Trabajos previos han demostrado que la inhibición de la señalización de PDGF con antagonistas del receptor de moléculas pequeñas y un aptámero específico de PDGF reduce la presión del líquido intersticial y aumenta la captación de productos quimioterapéuticos en tumores sólidos (Pietras *et al.*, (2001), Cancer Res., 61: 2929-2934).

En consecuencia, sería beneficioso tener nuevos materiales y métodos en terapia oncológica para reducir la IFP tumoral, reducir la angiogénesis tumoral y reducir los efectos deletéreos de la mutación por la expresión constitutiva de PDGF. La presente invención proporciona materiales y métodos para satisfacer estas y otras necesidades.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática del proceso de selección de aptámeros *in vitro* (SELEX™) de grupos de oligonucleótidos de secuencia aleatoria.

La Figura 2 es un esquema de las isoformas AA, BB, CC, DD y AB de PDGF y receptores afines.

La Figura 3 es un esquema de mutaciones génicas que dan lugar a la señalización de receptores de PDGF constitutiva en células cancerosas halladas en glioblastomas, leucemia mielomonocítica crónica (CMML), dermatofibrosarcoma protuberante (DFSP), tumores del estroma gastrointestinal (GIST) y otros sarcomas de tejido blando.

La Figura 4 es un esquema del transporte de citotoxinas a través de la vasculatura tumoral con y sin antagonistas de PDGF por los métodos de la presente invención.

La Figura 5A es una representación del análisis de HPLC de intercambio iónico de ARC 127 (5'-[PEG 40K]-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3' dT-3') recién sintetizado y almacenado a -20 °C durante dos años; la Figura 5B es un gráfico de barras de resultados del ensayo de proliferación de células 3T3 para ARC 126 (5'-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3' dT-3') y ARC 127 recién sintetizado y después de almacenamiento a -20 °C durante 2 años.

La Figura 6A es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de la composición de aptámero de PDGF que contiene 2'-fluoro de ARC 126; la Figura 6B es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de las variantes de ARC126 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').

La Figura 7A es una representación de resultados del ensayo de unión de competición para ARC 126 y variantes de composición ARC128 (5'-(SEC ID N°: 4)-HEG-(SEC ID N°: 5)-HEG-(SEC ID N°: 6) -3'), ARC513, ARC514, ARC515, ARC516; la Figura 7B es una representación de datos de ensayos de proliferación basados en células 3T3 *in vitro* que muestra la actividad de algunas variantes de composición de ARC 126.

La Figura 8A es una representación de un ensayo de unión de competición para ARC 126 y dos variantes que están conjugadas 5' con grupos de PEG de 30 kD (ARC308, 5'-[PEG 30K]-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)- 3' dT-3') y 40 kD (ARC127); la Figura 8B es una representación de datos de ensayo de proliferación basados en células 3T3 *in vitro* para ARC126 como una función de la conjugación del grupo de PEG 5' (ARC126+30kD = ARC308 y ARC126+PEG 40kD = ARC127).

La Figura 9A es una representación de un perfil farmacocinético de conjugados 5' de ARC 126 después de la administración IV a 10 mg/kg en ratones; la Figura 9B es una representación del perfil farmacocinético *in vivo* de ARC 127 (ARC 126 + PEG 40 kD) después de administración intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) y subcutánea (SC) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones; la Figura 9C es una representación del perfil de bioactividad de ARC 126+PEG 40 kD (es decir, ARC127) después de administración intravenosa (IV) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones.

La Figura 10A es una representación de un ensayo de unión de competición que muestra que ARC 126 se une con 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 con PDGF-AA; la Figura 11B es una presentación de un ensayo de unión de competición que muestra que ARC 126 se une con PDGF-BB humano, de rata y de ratón con una afinidad igual de aproximadamente 100 pM.

La Figura 11A es una representación 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 neutralizador de PDGF; la Figura 11B es una representación de un ensayo de proliferación de células 3T3 que muestra que ARC127 inhibe la proliferación de células 3T3 mejor que los inhibidores de tirosina quinasa conocidos ensayados.

La Figura 12 es una representación de los resultados de un ensayo de viabilidad celular que muestra que ARC127 por sí solo no tiene ningún efecto tóxico en las células 3T3.

La Figura 13 es una representación de datos de ensayo de migración celular realizado en formato de 96 pocillos usando el Ensayo de Migración de 96 Pocillos de Quimiotaxis QCM (Nº ECM 510) (Chemicon, Temecula, CA) que muestra que la señal de migración observada aumenta en función del número de células sembradas en placas o la concentración de PDGF creciente.

La Figura 14 es una representación de los resultados de un ensayo de luciferasa Elk conducido por PDGF que muestra que el ARC127 presenta una CI_{50} de 2 nM.

La Figura 15A es una representación del diámetro del tumor frente al tiempo en ratones desnudos Nu/Nu en un estudio de optimización de dosis de irinotecán/GLEEVEC™ en modelo de xenoinjerto de cáncer de colon H29; la Figura 15B es una representación del diámetro del tumor frente al tiempo en ratones desnudos Nu/Nu en un estudio de ARC127/irinotecán en modelo de xenoinjerto de cáncer de colon LS174T.

La Figura 16 es una representación del diámetro del tumor frente al tiempo en ratones desnudos Nu/Nu en regímenes de dosificación de irinotecán y GLEEVEC/ARC308 en un estudio de eficacia en modelo de xenotrasplante de cáncer de colon LS174T.

La Figura 17A es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de un aptámero que se une con VEGF pero no PDGF - ARC245 (SEC ID Nº: 7); la Figura 17B es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de un aptámero que se une con PDGF pero no VEGF, denominado en el presente documento ARC 126.

La Figura 18 es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de un aptámero bivalente que se une con PDGF y VEGF (secuencia TK.131.012.A, SEC ID Nº: 9); la Figura 18B es un esquema de la secuencia y estructura secundaria de un segundo aptámero bivalente que se une con PDGF y VEGF (secuencia TK.131.012B, SEC ID Nº: 10).

La Figura 19 es una representación de datos de unión de ensayo de transferencia puntual para los aptámeros constituyentes y los aptámeros multivalentes para PDGF BB (Panel 1) y VEGF (Panel 2).

La Figura 20 es un esquema de la secuencia y estructuras secundarias (sin una indicación de los enlaces fosforotioato) de aptámeros de PDGF que tienen islas o motivos CpG incorporados o incluidos en los mismos.

La Figura 21A es una representación de los resultados de un ensayo de ELISA de IL-6 que mide la liberación de IL-6 en células TIB usando ODN inmunoestimuladores conocidos como controles positivos, y aptámeros que no contienen islas de CpG como controles negativos en el ensayo, la Figura 21B es una representación de los resultados de un ensayo de ELISA de IL-6 que mide la liberación de IL-6 en células TIB usando el ISS ODN y versiones acortadas del ISS ODN; la Figura 21C es una representación 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 incorporado motivos de CpG; la Figura 21D es una representación 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 incorporado motivos CpG. La Figura 21E es una representación de los resultados de un ensayo de ELISA de TNF α que mide la liberación de TNF α en células TIB usando los mismos aptámeros de PDGF que en la Figura 21D en el que se han incorporado motivos CpG.

La Figura 22 es una ilustración que representa diversas estrategias para la síntesis de conjugados de ácido nucleico-PEG de alto peso molecular.

Las Figuras 23A-23B son gráficas que representan el análisis de unión de transferencia puntual para transcritos de ARN clonal.

La Figura 24 es una gráfica que representa el efecto inhibitor de diversos aptámeros de PDGF-AA de la invención (ARX33P1.D2, ARX33P1.E5 y ARX33P1.E10) en proliferación celular de 3T3 inducida por PDGF-AA.

La Figura 25 es una gráfica que representa el efecto de aptámeros de PDGF-AA en la proliferación de células 3T3 inducida por PDGF-BB.

Sumario de la invención

La presente divulgación proporcionar materiales y métodos para el tratamiento de cáncer, cánceres de tumores sólidos en particular, por la administración a pacientes de cantidades terapéuticamente eficaces de aptámeros o composiciones de aptámeros capaces de unirse con gran afinidad y especificidad con el factor de crecimiento

derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular, sus isoformas, sus receptores o cualquier combinación de los mismos, inhibiendo de este modo el papel biológico del ligando unido en el etiología del cáncer. Los aptámeros de la presente invención pueden usarse con agentes citotóxicos quimioterapéuticos conocidos y pueden incluir uno o más motivos CpG incluidos en el mismo o unidos a los mismos.

5 La presente divulgación proporciona aptámeros que se unen con PDGF. En una realización, los aptámeros que se unen con PDGF incluyen una secuencia de ácido nucleico 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 73, SEC ID N°: 77 a 81 y SEC ID N°: 85. En una realización, la secuencia oligonucleotídica del aptámero contiene menos de siete nucleótidos que tienen un sustituyente 2' fluoro.

10 Los aptámeros de la invención se unen con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y comprenden una estructura de secuencia de nucleótidos:

**dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 70),**

**dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 71),**

15 **dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 72);**

o

**dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 73)**

20 en la que d = desoxi, m = 2'-O-metilo, PEG = polietilenglicol.

La divulgación también proporciona aptámeros que incluyen una primera secuencia que se une con una primera diana y una segunda secuencia que se une con una segunda diana. En una realización, la primera diana es PDGF, isoformas de PDGF o 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. En una realización, los aptámeros que se unen con PDGF incluyen una secuencia de ácido nucleico 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 73, SEC ID N°: 77 a 81 y SEC ID N°: 85.

25 En una realización, la primera diana no estimula, tras su unión con el aptámero, una respuesta inmunitaria, y además, la segunda diana sí estimula, tras su unión con el aptámero, una respuesta inmunitaria. En una realización, la segunda diana es un receptor de tipo toll. En otra realización, la segunda secuencia es una secuencia inmunoestimuladora. En una realización, la secuencia inmunoestimuladora es un motivo CpG.

30 En una realización, la primera secuencia es capaz de unirse con una de las siguientes dianas: PDGF, IgE, IgE Fcε R1, PSMA, CD22, TNF-alfa, CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, FcRIIB, BTLA, TIM-3, CD11c, BAFF, B7-X, CD19, CD20, CD25 y CD33. En una realización, la primera secuencia es capaz de unirse con PDGF.

35 La presente invención también proporciona composiciones que contienen un aptámero de unión a PDGF de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 En una realización, las composiciones de la invención incluyen un aptámero de unión a PDGF de la invención, 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 tubulina, desestabilizadores de tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN y agentes alteradores 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 caliqueamicina, doxorubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorubicina, docetaxel, irinotecán, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.

45 La divulgación proporciona composiciones que incluyen un aptámero de unión a PDGF de la invención, un aptámero de unión a VEGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, estas composiciones también

incluyen un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen agentes que pertenecen a una clase de agentes citotóxicos seleccionada del grupo que consiste en estabilizadores de tubulina, desestabilizadores de tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN, y agentes alteradores vasculares. El agente citotóxico se usa solo o en combinaciones de uno o más agentes citotóxicos seleccionados del grupo que consiste en caliqueamicina, doxorrubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorrubicina, docetaxel, irinotecán, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.

La invención también proporciona métodos para tratar el cáncer administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de unión a PDGF de la invención. La invención también proporciona métodos para tratar el cáncer administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención.

En una realización, el cáncer o tumor es 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 de estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejido blando.

En una realización, la composición incluye un agente citotóxico que pertenece a una clase de agentes citotóxicos seleccionada del grupo que consiste en estabilizadores de tubulina, desestabilizadores de tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN, y agentes alteradores vasculares. En una realización, el agente citotóxico se usa solo o en combinaciones de uno o más agentes citotóxicos tales como caliqueamicina, doxorrubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorrubicina, docetaxel, irinotecán, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.

La divulgación también proporciona métodos para inhibir el crecimiento de un tumor sólido administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de unión a PDGF de la invención. La divulgación también proporciona métodos para inhibir el crecimiento de un tumor sólido administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención.

En una realización, el cáncer o tumor es 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 de estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejido blando.

En una realización, la composición incluye un agente citotóxico que pertenece a una clase de agentes citotóxicos seleccionada de los grupos consistentes en estabilizadores de tubulina, desestabilizadores de tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN, y agentes alteradores vasculares. En una realización, el agente citotóxico se usa solo o en combinaciones de uno o más agentes citotóxicos tales como caliqueamicina, doxorrubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorrubicina, docetaxel, irinotecán, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.

La invención también proporciona métodos para reducir la IFP en un tumor sólido administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de unión a PDGF de la invención. La invención también proporciona métodos para reducir la IFP en un tumor sólido administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención.

En una realización, el cáncer o tumor es 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 de estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejido blando.

En una realización, la composición incluye un agente citotóxico que pertenece a una clase de agentes citotóxicos seleccionada del grupo que consiste en estabilizadores de tubulina, desestabilizadores de tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos, agentes alquilantes de ADN, agentes modificadores de ADN, y agentes alteradores vasculares. En una realización, el agente citotóxico se usa solo o en combinaciones de uno o más agentes citotóxicos tales como caliqueamicina, doxorrubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorrubicina, docetaxel, irinotecán, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino y 5-fluoro-U.

La invención también proporciona métodos 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 invención. La invención también proporciona métodos para aumentar la permeabilidad de un tumor sólido a agentes citotóxicos administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención.

En una realización, el cáncer o tumor es 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 de estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejido blando.

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

La invención también proporciona métodos para reducir 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 invención. La invención también proporciona métodos para reducir la expresión constitutiva del factor de crecimiento derivado de plaquetas en un tumor administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención.

En una realización, el cáncer o tumor es 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 de estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejido blando.

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

La invención también proporciona métodos para reducir la angiogénesis y neovascularización en un tumor administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de unión a PDGF de la invención. La invención también proporciona métodos para reducir la angiogénesis y neovascularización en un tumor administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención.

En una realización, el cáncer o tumor es 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 de estroma gastrointestinal o un sarcoma de tejido blando.

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

Descripción detallada de la invención

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta posterior. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción. En la memoria descriptiva, las formas singulares también incluyen el plural a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva.

El método de SELEX™

Un método adecuado para generar un aptámero es con el proceso llamado "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial" ("SELEX™") representado en general en la Figura 1. El proceso SELEX™ es un método para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica con moléculas diana y se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.475.096 titulada "Ligandos de Ácido Nucleico" y la Patente de Estados Unidos Nº 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813) titulado "Ligandos de Ácido Nucleico". Cada ligando de ácido nucleico identificado por SELEX es un ligando específico de un compuesto o molécula diana dado. El proceso de SELEX™ se basa en la información única de que los ácidos nucleicos tienen suficiente capacidad para formar diversas estructuras bi y tridimensionales y suficiente versatilidad química disponible dentro de sus monómeros para actuar como ligandos (es decir, forman pares de unión específicos) con prácticamente cualquier compuesto químico, bien monomérico o bien polimérico. Las moléculas de cualquier tamaño o composición pueden actuar como dianas.

SELEX™ se basa como punto de partida en una gran biblioteca de moldes oligonucleotídicos monocatenarios que comprenden secuencias aleatorias derivadas de síntesis química en un sintetizador de ADN convencional. En algunos ejemplos, se explora una población de oligonucleótidos 100 % aleatorios. En otros, cada oligonucleótido en la población comprende una secuencia aleatoria y al menos una secuencia fija en su extremo 5' y/o 3' que comprende una secuencia compartida por todas las moléculas de la población de oligonucleótidos. Las secuencias fijas incluyen secuencias tales como sitios de hibridación para cebadores de PCR, secuencias promotoras para ARN polimerasas (por ejemplo, T3, T4, T7, SP6, y similares), sitios de restricción o secuencias homopoliméricas, tales como tramos poli A o poli T, núcleos catalíticos, sitios para unión selectiva con columnas de afinidad y otras secuencias para facilitar la clonación y/o secuenciación de un oligonucleótido de interés.

La parte de secuencia aleatoria del oligonucleótido puede ser de cualquier longitud y puede comprender ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos y puede incluir nucleótidos modificados o no naturales o análogos de nucleótidos. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 5.958.691; 5.660.985; 5.958.691; 5.698.687; 5.817.635; y 5.672.695, publicación de PCT WO 92/07065. Los oligonucleótidos aleatorios pueden sintetizarse a partir de nucleótidos ligados por fosfodiéster usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos de fase sólida bien conocidas en este campo (Froehler *et al.*, Nucl. Acid Res. 14: 5399-5467 (1986); Froehler *et al.*, Tet. Lett. 27: 5575-5578 (1986)). Los oligonucleótidos también pueden sintetizarse usando métodos de fase de solución tales como métodos de síntesis de triéster (Sood *et al.*, Nucl. Acid Res. 4: 2557 (1977); Hirose *et al.*, Tet. Lett., 28: 2449 (1978)). Las síntesis típicas llevadas a cabo en equipamiento de síntesis de ADN automático producen 10^{15} - 10^{17} moléculas. Regiones suficientemente grandes de secuencias aleatorias en el diseño de secuencia aumentan la probabilidad de que cada molécula sintetizada represente probablemente una única secuencia.

Para sintetizar secuencias aleatorias, se añaden mezclas de los cuatro nucleótidos en cada etapa de adición de nucleótidos durante el proceso de síntesis, permitiendo la incorporación aleatoria de nucleótidos. En una realización, los oligonucleótidos aleatorios comprenden secuencias completamente aleatorias; sin embargo, en otras realizaciones, los oligonucleótidos aleatorios pueden comprender tramos de secuencias no aleatorias o parcialmente aleatorias. Pueden crearse secuencias parcialmente aleatorias añadiendo los cuatro nucleótidos en diferentes relaciones molares en cada etapa de adición.

Las moléculas molde contienen normalmente secuencias 5' y 3' terminales fijas que flanquean una región interna de 30-50 nucleótidos aleatorios. Una síntesis a escala convencional (1 μ mol) producirá 10^{15} - 10^{16} moléculas molde individuales, suficientes para la mayoría de experimentos de SELEX. La biblioteca de ARN se genera a partir de esta biblioteca de partida por transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa T7 recombinante. Esta biblioteca se mezcla después con la diana en condiciones favorables para la unión y se somete a iteraciones por etapas de unión, partición y amplificación, usando el mismo esquema de selección general, para conseguir prácticamente cualquier criterio deseado de afinidad y selectividad de unión. Comenzando a partir de una mezcla de ácidos nucleicos, que comprenden preferentemente un segmento de secuencia aleatoria, el método de SELEX™ incluye etapas de poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión, separar ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido específicamente a moléculas diana, disociar los complejos de ácido nucleico-diana, amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-diana para producir una mezcla enriquecida en ligando de ácidos nucleicos, después reiterar las etapas de unión, partición, disociación y amplificación durante tantos ciclos como se desee para producir ligandos de ácido nucleico altamente específicos, de alta afinidad para la molécula diana.

Dentro de una mezcla de ácido nucleico que contiene un gran número de posibles secuencias y estructuras, hay una amplia serie de afinidades de unión para una diana dada. Una mezcla de ácido nucleico que comprende, por ejemplo, un segmento aleatorio de 20 nucleótidos, puede tener 4^{20} posibilidades candidatas. Es más probable que las que tienen las constantes de mayor afinidad para la diana se unan con la diana. Después de separar, disociar y amplificar, se genera una segunda mezcla de ácido nucleico, enriquecida con respecto a los candidatos de mayor afinidad de unión. Ciclos adicionales de selección favorecen progresivamente los mejores ligandos hasta que la mezcla de ácidos nucleicos resultante está compuesta predominantemente de solamente una o algunas secuencias. Estas pueden después clonarse, secuenciarse y ensayarse individualmente con respecto a afinidad de unión como ligandos puros.

Los ciclos de selección y amplificación se repiten hasta que se consigue un objetivo deseado. En el caso más general, la selección/amplificación se continúa hasta que no se consiguen mejoras significativas en la fuerza de unión tras la repetición del ciclo. El método puede usarse para tomar muestras de hasta aproximadamente 10^{18} especies de ácido nucleico diferentes. Los ácidos nucleicos de la mezcla de ensayo preferentemente incluyen una parte de secuencia aleatoria así como secuencias conservadas necesarias para la amplificación eficaz. Las variantes de secuencia de ácido nucleico pueden producirse de varias maneras incluyendo síntesis de secuencias de ácido nucleico aleatorias y selección de tamaño de ácidos nucleicos celulares escindidos aleatoriamente. La parte de secuencia variable puede contener secuencia completa o parcialmente aleatoria; también puede contener subpartes de secuencia conservada incorporadas con secuencia aleatoria. La variación de secuencia en ácidos nucleicos de ensayo puede introducirse o aumentarse por mutagénesis antes o durante las iteraciones de selección/amplificación.

En una realización de SELEX™, el proceso de selección es tan eficaz en el aislamiento de los ligandos de ácido nucleico que se unen más fuertemente con la diana seleccionada, que se requiere solamente un ciclo de selección y amplificación. Dicha selección eficaz puede producirse, por ejemplo, en un proceso de tipo cromatográfico en el que la capacidad de los ácidos nucleicos para asociarse con dianas unidas en una columna actúa de tal manera que la columna es suficientemente capaz de permitir la separación y el aislamiento de los ligandos de ácido nucleico de mayor afinidad.

En muchos casos, no es necesariamente deseable realizar las etapas por iteraciones de SELEX™ hasta que se ha identificado un único ligando de ácido nucleico. La solución de ligando de ácido nucleico específico de diana puede incluir una familia de estructuras o motivos de ácido nucleico que tienen varias secuencias conservadas y varias secuencias que pueden sustituirse o añadirse sin afectar significativamente a la afinidad de los ligandos de ácido nucleico por la diana. Terminando el proceso de SELEX™ antes de completarse, es posible determinar la secuencia de varios miembros de la familia de solución de ligando de ácido nucleico.

Se sabe que existe diversas estructuras primarias, secundarias y terciarias de ácido nucleico. Las estructuras o motivos que se ha mostrado más habitualmente que están implicados en iteraciones de tipo no Watson-Crick se denominan bucles en horquilla, protuberancias simétricas y asimétricas, pseudonudos y múltiples combinaciones de los mismos. Casi todos los casos conocidos de dichos motivos sugieren que pueden formarse en una secuencia de ácido nucleico de no más de 30 nucleótidos. Por esta razón, se prefiere con frecuencia que los procedimientos de SELEX con segmentos aleatorios contiguos se inicien con secuencias de ácido nucleico que contengan un segmento aleatorio de entre aproximadamente 20 y 50 nucleótidos.

El método de SELEX™ principal se ha modificado para conseguir varios objetivos específicos. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.707.796 describe el uso de SELEX™ junto con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas, tales como ADN plegado. La Patente de Estados Unidos Nº 5.763.177 describe métodos basados en SELEX™ para seleccionar ligandos de ácido nucleico que contienen grupos fotorreactivos capaces de unirse y/o fotorreticular con y/o fotoinactivar una molécula diana. La Patente de Estados Unidos Nº 5.567.588 y la Patente de Estados Unidos Nº 5.861.254, describen métodos basados en SELEX™ que consiguen una separación altamente eficaz entre oligonucleótidos que tienen alta y baja afinidad por una molécula diana. La Patente de Estados Unidos Nº 5.496.938 describe métodos para obtener ligandos de ácido nucleico mejorados después de haberse realizado el proceso de SELEX™. La Patente de Estados Unidos Nº 5.705.337 describe métodos para unir covalentemente un ligando con su diana.

SELEX™ también puede usarse para obtener ligandos de ácido nucleico que se unen con más de un sitio en la molécula diana, y para obtener ligandos de ácido nucleico que incluyen especies no de ácido nucleico que se unen con sitios específicos en la diana. SELEX™ proporciona medios para aislar e identificar ligandos de ácido nucleico que se unen con cualquier diana previsible, incluyendo biomoléculas grandes y pequeñas incluyendo proteínas (incluyendo tanto proteínas de unión a ácido nucleico como proteínas que no se sabe que se unan a ácidos nucleicos como parte de su función biológica), cofactores y otras moléculas pequeñas. Por ejemplo, véase Patente de Estados Unidos Nº 5.580.737 que desvela secuencias de ácido nucleico identificadas mediante SELEX™ que son capaces de unirse con alta afinidad con cafeína y el análogo estrechamente relacionado, teofilina.

El contra SELEX™ es un método para mejorar la especificidad de ligandos de ácido nucleico por una molécula diana eliminando las secuencias de ligando de ácido nucleico con reactividad cruzada por una o más moléculas no diana. El contra SELEX™ está comprendido por las etapas de a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; b) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en el que los ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana en relación con la mezcla candidata pueden separarse del resto de la mezcla candidata; c) separar los ácidos nucleicos de afinidad aumentada del resto de la mezcla candidata; d) poner en contacto los ácidos nucleicos de afinidad aumentada con una o más moléculas no diana de modo que se retiren los ligandos de ácido nucleico con afinidad específica por la molécula o las moléculas no diana; y e) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad específica por la molécula diana para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecidos con respecto a secuencias de ácido nucleico con una afinidad y especificidad relativamente mayores para la unión con la molécula diana.

Un problema potencial encontrado en el uso de ácidos nucleicos como productos terapéuticos y vacunas es que los oligonucleótidos en su forma fosfodiéster pueden degradarse rápidamente en los fluidos corporales por enzimas intracelulares y extracelulares tales como endonucleasas y exonucleasas antes de que el efecto deseado sea manifiesto. El método de SELEX abarca por lo tanto la identificación de ligandos de ácido nucleico de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas en el ligando, tales como estabilidad *in vivo* mejorada o características de suministro mejoradas. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de ribosa, fosfato y/o base. Se describen nucleótidos modificados que contienen ligandos de ácido nucleico identificados por SELEX en la Patente de Estados Unidos 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 Estados Unidos Nº 5.756.703 describe oligonucleótidos que contienen diversas pirimidinas 2' modificadas. La Patente de Estados Unidos Nº 5.580.737 describe ligandos de ácido nucleico altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con

sustituyentes 2'-amino (2'-H₂), 2'-fluoro (2'-F) y/o 2'-O-metilo (2'-OMe).

Las modificaciones de los ligandos de ácido nucleico contemplados en la presente invención incluyen, pero sin limitación, las que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, hidrofobicidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y fluxionalidad a las bases de ligando de ácido nucleico o al ligando de ácido nucleico en su totalidad. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificaciones de azúcar en la posición 2', modificaciones de pirimidina en la posición 5, modificaciones de purina en la posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodouracilo; modificaciones de cadena principal, modificaciones de fosforotioato o alquil fosfato, metilaciones, combinaciones de formación de pares de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5' tales como recubrimiento de extremos.

Las modificaciones pueden ser modificaciones antes o después del proceso de SELEX. Las modificaciones antes del proceso de SELEX producen ligandos de ácido nucleico tanto con especificidad por su diana de SELEX como con estabilidad *in vivo* mejorada. Las modificaciones después del proceso de SELEX realizadas a ligandos de ácido nucleico 2'-OH pueden dar como resultado estabilidad *in vivo* mejorada sin afectar de forma adversa a la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico.

Otras modificaciones se conocen por un experto habitual en la materia. Dichas modificaciones pueden realizarse después del proceso de SELEX (modificación de ligandos no modificados previamente identificados) o mediante incorporación en el proceso de SELEX.

El método de SELEX abarca combinar oligonucleótidos seleccionados con otros oligonucleótidos seleccionados y unidades funcionales no oligonucleotídicas como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.637.459 y Patente de Estados Unidos N° 5.683.867. El método de SELEX abarca además 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 en la Patente de Estados Unidos N° 6.011.020. Los ligandos de ácido nucleico de VEGF que se asocian con un compuesto lipófilo, tales como diacilglicerol o dialquilglicerol, en un complejo de diagnóstico o terapéutico se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.859.228.

Se describen adicionalmente ligandos de ácido nucleico de VEGF que se asocian con un compuesto lipófilo, tales como un lípido de glicerol, o un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico, tal como polialquilenglicerol, en la Patente de Estados Unidos N° 6.051.698. Se describen adicionalmente ligandos de ácido nucleico de VEGF que se asocian con un compuesto de alto peso molecular, no inmunogénico o un compuesto lipófilo en la Publicación de PCT N° WO 98/18480. Estas patentes y solicitudes permiten la combinación de una amplia serie de formas y otras propiedades, y las propiedades de amplificación y replicación eficaces, de oligonucleótidos con las propiedades deseables de otras moléculas.

También se ha explorado la identificación de ligandos de ácido nucleico con péptidos pequeños, flexibles mediante el método de SELEX. Los péptidos pequeños tienen estructuras flexibles y habitualmente existen en solución en un equilibrio de múltiples conformeros, y por lo tanto se creyó inicialmente que las afinidades de unión pueden estar limitadas por la entropía conformacional perdida tras la unión con un péptido flexible. Sin embargo, la viabilidad de identificar ligandos de ácido nucleico para péptidos pequeños en solución se demostró en la Patente de Estados Unidos N° 5.648.214. En esta patente, se identificaron ligandos de ácido nucleico de ARN de alta afinidad para la sustancia P, un péptido de 11 aminoácidos.

Para generar poblaciones de oligonucleótidos que son resistentes a nucleasas e hidrólisis, pueden usarse oligonucleótidos modificados y pueden incluir uno o más enlaces internucleotídicos sustitutos, azúcares alterados, bases alteradas o combinaciones de los mismos. En una realización, se proporcionan oligonucleótidos en los que el grupo P(O)O se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), P(O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal") o 3'-amina (-NH-CH₂-CH₂-), en los que cada R o R' es de forma independiente H o alquilo sustituido o no sustituido. Pueden unirse grupos de enlace a nucleótidos adyacentes mediante un enlace -O-, -N- o -S-. No se requiere que todos los enlaces en el oligonucleótido sean idénticos.

En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos comprenden grupos de azúcares modificados, por ejemplo, uno o más de los grupos hidroxilo se reemplaza con halógeno, grupos alifáticos, o se funcionalizan como éteres o aminas. En una realización, la posición 2' del resto de furanosa se sustituye por cualquiera de un grupo O-metilo, O-alquilo, O-alilo, S-alquilo, S-alilo o halo. Se describen métodos de síntesis de azúcares 2' modificados en Sproat, *et al.*, Nucl. Acid Res. 19: 733-738 (1991); Cotten, *et al.*, Nucl. Acid Res. 19: 2629-2635 (1991); y Hobbs, *et al.*, Biochemistry 12: 5138-5145 (1973). El uso de moléculas oligoméricas de 2-fluororribonucleótidos puede aumentar la sensibilidad de una molécula de ácido nucleico o una molécula diana de diez a cien veces por encima de las generadas usando ribo o desoxirribonucleótidos no sustituidos (Pagratis, *et al.*, Nat. Biotechnol. 15: 68-73 (1997)), proporcionando interacciones de unión adicionales con una molécula diana y aumentando la estabilidad de la estructura o las estructuras secundarias de la molécula de ácido nucleico (Kraus, *et al.*, Journal of Immunology 160: 5209-5212 (1998); Pieken, *et al.*, Science 253: 314-317 (1991); Lin, *et al.*, Nucl. Acids Res. 22: 5529-5234 (1994); Jellinek, *et al.* Biochemistry 34: 11363-11372 (1995); Pagratis, *et al.*, Nat. Biotechnol 15: 68-73 (1997)).

Las moléculas de aptámeros de ácido nucleico se seleccionan generalmente en un procedimiento de 5 a 20 ciclos. En una realización, se introduce heterogeneidad solamente en los estadios de selección iniciales y no aparece durante el proceso de replicación.

5 La biblioteca de partida de secuencias de ADN se genera por síntesis química automática en un sintetizador de ADN. Esta biblioteca de secuencias se transcribe *in vitro* a ARN usando ARN polimerasa T7 o ARN polimerasas T7 modificadas y se purifican. En un ejemplo, la secuencia 5'-fijo:aleatorio:3'-fijo se separa por una secuencia aleatoria que tiene de 30 a 50 nucleótidos.

10 Los aptámeros con especificidad y afinidad de unión por las dianas de la presente invención se seleccionan por el proceso de SELEX descrito anteriormente. Como parte del proceso de SELEX las secuencias seleccionadas para unirse con la diana se minimizan después opcionalmente para determinar la secuencia mínima que tiene afinidad de unión, y se optimizan realizando mutagénesis aleatoria o dirigida de la secuencia minimizada para determinar si los aumentos de afinidad o como alternativa qué posiciones de la secuencia son esenciales para la actividad de unión.
15 Adicionalmente, puede realizarse selecciones con secuencias que incorporan secuencias modificadas para estabilizar las moléculas de aptámeros frente a la degradación *in vivo*.

SELEX™ 2' modificado

20 Además, el método de SELEX™ puede realizarse para generar aptámeros 2' modificados como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004197804.

Para que un aptámero sea adecuado para su uso como un producto terapéutico, es preferentemente barato de sintetizar, seguro y estable *in vivo*. Los aptámeros de ARN y ADN de tipo silvestre normalmente no son estables *in vivo* debido a su susceptibilidad a la degradación por nucleasas. La resistencia a la degradación por nucleasas puede aumentarse en gran medida mediante la incorporación de grupos modificadores en la posición 2'. Se han incorporado con éxito grupos fluoro y amino en bibliotecas de oligonucleótidos de las que se han seleccionado posteriormente aptámeros. Sin embargo, estas modificaciones aumentan en gran medida el coste de la síntesis del aptámero resultante, y pueden introducir preocupaciones de seguridad debido a la posibilidad de que los nucleótidos modificados pudieran reciclarse en ADN hospedador, mediante degradación de los oligonucleótidos modificados y posterior uso de los nucleótidos como sustratos para síntesis de ADN.
25
30

Los aptámeros que contienen nucleótidos 2'-O-metilo (2'-OMe) superan muchos de estos inconvenientes. Los oligonucleótidos que contienen nucleótidos 2'-O-metilo son resistentes a nucleasa y baratos de sintetizar. Aunque los nucleótidos 2'-O-metilo son ubicuos en sistemas biológicos, las polimerasas naturales no aceptan NTP 2'-O-metilo como sustratos en condiciones fisiológicas, por lo tanto no hay preocupaciones de seguridad sobre el reciclaje de nucleótidos 2'-O-metilo en ADN hospedador.
35

La presente divulgación también proporciona materiales y métodos para producir oligonucleótidos estabilizados, incluyendo, por ejemplo, aptámeros, que contienen nucleótidos modificados (por ejemplo, nucleótidos que tienen una modificación en la posición 2') que hacen al oligonucleótido más estable que el oligonucleótido no modificado. Los oligonucleótidos estabilizados producidos por los materiales y métodos de la presente invención también son más estables a la degradación enzimática y química así como degradación térmica y física. Por ejemplo, los oligonucleótidos que contienen nucleótidos 2'-O-metilo son resistentes a nucleasa y baratos de sintetizar. Aunque los nucleótidos 2'-O-metilo son ubicuos en sistemas biológicos, las polimerasas naturales no aceptan NTP 2'-O-metilo como sustratos en condiciones fisiológicas, por lo tanto no hay preocupaciones de seguridad sobre el reciclaje de nucleótidos 2'-O-metilo en ADN hospedador.
40
45

En una realización, la presente divulgación proporciona combinaciones de modificaciones 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 combinaciones de modificaciones 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH₂ y 2'-metoxietilo de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP. En una realización, la presente divulgación proporciona 5⁶ combinaciones de modificaciones 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH₂ y 2'-metoxietilo de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP.
50

Se crean aptámeros 2' modificados de la invención usando polimerasas modificadas, tales como por ejemplo, una polimerasa T7 modificada, que tiene una mayor tasa de incorporación de nucleótidos modificados que tienen sustituyentes voluminosos en la posición 2' de furanosa, que las polimerasas de tipo silvestre. Por ejemplo, se ha descrito un doble mutante de polimerasa T7 (Y639F/H784A) que tiene la histidina en la posición 784 cambiada a una alanina, u otro resto de aminoácido pequeño, además de la mutación Y639F para la incorporación de sustituyentes 2' voluminosos y se ha usado para incorporar NTP de pirimidina modificados. También se ha descrito un mutante individual de polimerasa T7 (H784A) que tiene la histidina en la posición 784 cambiada a un resto de alanina. (Padilla *et al.*, Nucleic Acids Research, 2002, 30: 138). Tanto en el doble mutante Y639F/H784A como en el mutante individual H784A de polimerasas T7, el cambio a restos de aminoácidos más pequeños permite la incorporación de sustratos de nucleótidos más voluminosos, por ejemplo, nucleótidos 2'-O metilo sustituidos.
55
60
65

Otro factor importante de la producción de aptámeros 2' modificados es el uso tanto de magnesio divalente como de manganeso en la mezcla de transcripción. Se ha descubierto que diferentes combinaciones de concentraciones de cloruro de magnesio y cloruro de manganeso afectan a las producciones de transcritos 2'-O-metilados, siendo la concentración óptima del cloruro de magnesio y de manganeso dependiente de la concentración de la mezcla de reacción de transcripción de NTP que forman complejo con iones metálicos divalentes.

También es importante el uso de cebadores en la transcripción con GMP o guanosina. Este efecto resulta de la especificidad de la polimerasa por el nucleótido de inicio. Como resultado, el nucleótido 5' terminal de cualquier transcrito generado de esta manera es probablemente 2'-OH G. La concentración preferida de GMP (o guanosina) es 0,5 mM y aún más preferentemente 1 mM. También se ha descubierto que la inclusión de PEG, preferentemente PEG-8000, en la reacción de transcripción es útil para maximizar la incorporación de nucleótidos modificados.

Hay varios ejemplos de aptámeros que contienen 2'-OMe en la bibliografía, véase, por ejemplo Green *et al.*, Current Biology 2, 683-695, 1995. Estos se generaron por la selección *in vitro* de bibliotecas de transcritos modificados en los que los restos C y U estaban 2'-fluoro (2'-F) sustituidos y los restos A y G eran 2'-OH. Una vez que se hubo identificado secuencias funcionales, entonces se ensayó cada resto A y G con respecto a tolerancia a la sustitución de 2'-OMe, y el aptámero se volvió a sintetizar teniendo todos los restos A y G que toleraban la sustitución 2'-OMe como restos 2'-OMe. La mayoría de los restos de A y G de aptámeros generados de esta manera de dos etapas toleran la sustitución con restos 2'-OMe, aunque, de media, aproximadamente el 20 % no. En consecuencia, los aptámeros generados usando este método tienden a contener de dos a cuatro restos 2'-OH, y la estabilidad y el coste de la síntesis se ven comprometidos como resultado. Incorporando nucleótidos modificados en la reacción de transcripción que genera oligonucleótidos estabilizados usados en bibliotecas de oligonucleótidos de las que se selecciona aptámeros y se enriquecen por SELEX™ (y/o cualquiera de sus variaciones y mejoras, incluyendo las descritas posteriormente), los métodos 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).

Además, los oligonucleótidos modificados pueden estabilizarse adicionalmente después de haberse completado el proceso de selección (Véase "modificaciones post SELEX™", incluyendo truncamiento, delección y modificación, posteriormente).

Para generar poblaciones de oligonucleótidos que son resistentes a nucleasas e hidrólisis, pueden usarse oligonucleótidos modificados y pueden incluir uno o más enlaces internucleotídicos sustitutos, azúcares alterados, bases alteradas o combinaciones de los mismos. En una realización, se proporcionan oligonucleótidos en los que el grupo P(O)O se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), P(O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal") o 3'-amina (-NH-CH₂-CH₂-), en los que cada R o R' es de forma independiente H o alquilo sustituido o no sustituido. Pueden unirse grupos de enlace a nucleótidos adyacentes mediante un enlace -O-, -N- o -S-. No es necesario que todos los enlaces en el oligonucleótido sean idénticos.

Se consigue incorporación de nucleótidos modificados en los aptámeros antes (pre) del proceso de selección (por ejemplo, una modificación antes del proceso de SELEX™). Opcionalmente, los aptámeros en los que se han incorporado nucleótidos modificados por modificación antes del proceso de SELEX™ pueden modificarse adicionalmente por modificación después del proceso de SELEX™ (es decir, una modificación después del proceso de SELEX™ después de una modificación pre SELEX™). Las modificaciones antes del proceso de SELEX™ producen ligandos de ácido nucleico modificados con especificidad por la diana de SELEX™ y también estabilidad *in vivo* mejorada. Las modificaciones después del proceso de SELEX™ (por ejemplo, modificación de ligandos previamente identificados que tienen nucleótidos incorporados por modificación antes del proceso de SELEX™) pueden dar como resultado una mejora adicional de la estabilidad *in vivo* sin afectar de forma adversa a la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico que tiene nucleótidos incorporados por modificación antes del proceso de SELEX™.

Polimerasas modificadas

Un mutante individual de polimerasa T7 (Y639F) en el que el resto de tirosina en la posición 639 se ha cambiado a fenilalanina utiliza fácilmente 2'desoxi, 2'amino y 2'fluoro-nucleotidotrifosfatos (NTP) como sustratos y se ha usado ampliamente para sintetizar ARN modificados para diversas aplicaciones. Sin embargo, se ha indicado que este mutante de polimerasa T7 no puede utilizar fácilmente (por ejemplo incorporar) NTP con sustituyentes 2' más voluminosos, tales como sustituyentes 2'-O-metilo (2'-OMe) o 2'-azido (2'-N₃). Para la incorporación de sustituyentes 2' voluminosos, se ha descrito un doble mutante de polimerasa T7 (Y639F/H784A) que tiene la histidina en la posición 784 cambiada a una alanina, u otro resto de aminoácido pequeño, además de la mutación Y639F y se ha usado para incorporar NTP de pirimidina modificados. También se ha descrito un mutante individual de polimerasa T7 (H784A) que tiene la histidina en la posición 784 cambiada a un resto de alanina. (Padilla *et al.*, Nucleic Acids Research, 2002, 30: 138). Tanto en el mutante doble Y639F/H784A como en el mutante individual H784A de polimerasas T7, el cambio a restos de aminoácidos menores permite la incorporación de sustratos de nucleótidos más voluminosos, por ejemplo, nucleótidos 2'-O metilo sustituidos.

La presente divulgación proporciona métodos y condiciones para usar estas y otras polimerasas T7 modificadas que tienen una tasa de incorporación mayor de nucleótidos modificados que tienen sustituyentes voluminosos en la posición 2' de furanosa, que las polimerasas de tipo silvestre. En general, se ha descubierto que en las condiciones desveladas en el presente documento, el mutante individual Y693F puede usarse para la incorporación de todos los NTP 2'-OMe sustituidos excepto GTP y el mutante doble Y639F/H784A puede usarse para la incorporación de todos los NTP 2'-OMe sustituidos incluyendo GTP. Se espera que el mutante individual H784A posea propiedades similares cuando se usa en las condiciones desveladas en el presente documento.

La presente divulgación proporciona métodos y condiciones para que las polimerasas T7 modificadas incorporen enzimáticamente nucleótidos modificados en oligonucleótidos. Dichos oligonucleótidos pueden sintetizarse completamente de nucleótidos modificados, o con un subconjunto de nucleótidos modificados. Las modificaciones pueden ser iguales o diferentes. Todos los nucleótidos pueden estar modificados y todos pueden contener la misma modificación. Todos los nucleótidos pueden estar modificados, pero contener 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 diferentes tipos de modificación. Todos los nucleótidos de purina pueden tener un tipo de modificación (o no estar modificados), mientras que todos los nucleótidos de pirimidina tienen otro tipo diferente de modificación (o no están modificados). De esta manera, se generan transcritos, o bibliotecas de transcritos, usando cualquier combinación de modificaciones, por ejemplo, ribonucleótidos, (2'-OH, "rN"), desoxirribonucleótidos (2'-desoxi), nucleótidos 2'-F y 2'-OMe. Una mezcla que contiene 2'-OMe C y U y 2'-OH A y G se denomina "rRmY"; una mezcla que contiene desoxi A y G y 2'-OMe U y C se denomina "dRmY"; una mezcla que contiene 2'-OMe A, C y U y 2'-OH G se denomina "rGmH"; una mezcla que contiene alternativamente 2'-OMe A, C, U y G y 2'-OMe A, U y C y 2'-F G se denomina "toggle"; una mezcla que contiene 2'-OMe A, U, C y G, en la que hasta el 10 % de las G son 2'-OH se denomina "r/mGmH"; una mezcla que contiene 2'-O Me A, U y C, y 2'-F G se denomina "fGmH"; y una mezcla que contiene desoxi A y 2'-OMe C, G y U se denomina "dAmB".

Una realización preferida incluye cualquier combinación de nucleótidos 2'-OH, 2'-desoxi y 2'-OMe. Una realización más preferida incluye cualquier combinación de nucleótidos 2'-desoxi y 2'-OMe. Una realización aún más preferida es con cualquier combinación de nucleótidos 2'-desoxi y 2'-OMe en los que las pirimidinas son 2'-OMe (tales como dRmY, mN o dGmH).

SELEXT™ de nucleótidos 2'-O-metilo modificados

La presente divulgación proporciona métodos para generar bibliotecas de transcritos de ARN 2' modificados (por ejemplo, 2'-OMe) en condiciones en las que una polimerasa acepta NTP 2' modificados. Preferentemente, la polimerasa es el mutante doble Y693F/H784A o el mutante individual Y693F. También pueden usarse otras polimerasas, particularmente las que muestran una alta tolerancia por sustituyentes 2' voluminosos. Dichas polimerasas pueden explorarse con respecto a esta capacidad ensayando su capacidad para incorporar nucleótidos modificados en las condiciones de transcripción desveladas en el presente documento. Se ha determinado que varios factores son cruciales para las condiciones de transcripción útiles en los métodos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, se observan grandes aumentos en las producciones de transcrito modificado cuando se incorpora una secuencia líder en el extremo 5' de una secuencia fija en el extremo 5' del molde de transcripción de ADN, de modo que al menos aproximadamente los 6 primeros restos del transcrito resultante son todos purinas.

Otro factor importante en la obtención de transcritos que incorporan nucleótidos modificados es la presencia o concentración de 2'-OH GTP. La transcripción puede dividirse en dos fases: la primera fase es el inicio, durante el que se añade un NTP al extremo 3'-hidroxilo de GTP (u otra guanosina sustituida) para producir un dinucleótido que después se extiende en aproximadamente 10-12 nucleótidos, la segunda fase es la elongación, durante la que se produce transcripción más allá de la adición de los primeros aproximadamente 10-12 nucleótidos. Se ha descubierto que cantidades pequeñas 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 que la transcripción entra en la fase de elongación la diferenciación reducida entre 2'-OMe y 2'.OH GTP, y el exceso de 2'-OMe GTP frente a 2'-OH GTP permiten la incorporación de principalmente el 2'-OMe GTP.

Otro factor importante en la incorporación de 2'-OMe en transcritos es el uso tanto de magnesio como de manganeso divalentes en la mezcla de transcripción. Se ha descubierto que diferentes combinaciones de concentraciones de cloruro de magnesio y cloruro de manganeso afectan a las producciones de transcritos 2'-O-metilados, siendo la concentración óptima del cloruro de magnesio y manganeso dependiente de la concentración en la mezcla de reacción de transcripción de NTP que forman complejo con iones metálicos divalentes. Para obtener las mayores producciones de transcritos O metilados 2' sustituidos al máximo (es decir, todos los A, C y U y aproximadamente el 90 % de los nucleótidos G), se prefieren concentraciones de aproximadamente 5 mM de cloruro de magnesio y 1,5 mM de cloruro de manganeso cuando está presente cada NTP a una concentración de 0,5 mM. Cuando la concentración de cada NTP es 1,0 mM, se prefieren concentraciones de aproximadamente 6,5 mM de cloruro de magnesio y 2,0 mM de cloruro de manganeso. Cuando la concentración de cada NTP es 2,0 mM, se prefieren concentraciones de aproximadamente 9,6 mM de cloruro de magnesio y 2,9 mM de cloruro de manganeso. En cualquier caso, diferencias con estas concentraciones de hasta el doble aún proporcionan cantidades

significativas de transcritos modificados.

También es importante el inicio de la transcripción con GMP o guanosina. Este efecto resulta de la especificidad de la polimerasa para el nucleótido de inicio. Como resultado, el nucleótido 5' terminal de cualquier transcrito generado de esta manera probablemente sea 2'-OH G. La concentración preferida de GMP (o guanosina) es de 0,5 mM y aún 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.

Para incorporación máxima 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 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 5 mM (6,5 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe NTP sea 1,0 mM), MnCl₂ 1,5 mM (2,0 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe-NTP sea 1,0 mM), 2'-OMe NTP (cada uno) 500 pM (más preferentemente, 1,0 mM), 2'-OH GTP 30 μM, 2'-OH GMP 500 μM, pH 7,5, ARN Polimerasa T7 Y639F/H784A 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia líder toda de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud. Como se usa en el presente documento, una unidad de la ARN polimerasa T7 mutante Y639F/H784A, o cualquier otra ARN polimerasa T7 mutante especificada en el presente documento, se define como la cantidad de enzima requerida para incorporar 1 nmol de 2'-OMe NTP en transcritos en las condiciones de r/mGmH. Como se usa en el presente documento, una unidad de pirofosfatasa inorgánica se define como la cantidad de enzima que liberará 1,0 moles de ortofosfato inorgánico por minuto a pH 7,2 y 25 °C.

Para incorporación máxima (100 %) de 2'-OMe ATP, UTP y CTP ("rGmH") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 5 mM (9,6 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe NTP sea 2,0 mM), MnCl₂ 1,5 mM (2,9 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe NTP sea 2,0 mM), 2'-OMe NTP (cada uno) 500 μM (más preferentemente, 2,0 mM), pH 7,5, ARN Polimerasa T7 Y639F 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia líder toda de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud.

Para 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 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 5 mM (9,6 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe NTP sea 2,0 mM), MnCl₂ 1,5 mM (2,9 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe NTP sea 2,0 mM), 2'-OMe NTP (cada uno) 500 μM (más preferentemente, 2,0 mM), pH 7,5, ARN Polimerasa T7 Y639F/H784A 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia líder toda de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud.

Para 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, espermina o espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 9,6 mM, MnCl₂ 2,9 mM, 2'-OMe NTP (cada uno) 2,0 mM, pH 7,5, ARN Polimerasa T7 Y639F 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia líder toda de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud.

Para 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 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 9,6 mM, MnCl₂ 2,9 mM, 2'-OMe NTP (cada uno) 2,0 mM, pH 7,5, ARN Polimerasa T7 Y639F 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia líder toda de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud.

Para 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 % (p/v), Triton H-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 9,6 mM, MnCl₂ 2,9 mM, 2'-OMe NTP (cada uno) 2,0 mM, pH 7,5, ARN Polimerasa T7 Y639F 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia líder toda de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud.

Para cada uno de los anteriores, (1) la transcripción se realiza preferentemente a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 45 °C durante un periodo de al menos dos horas y (2) se usan 50-300 nM de un molde de transcripción de ADN bicatenario (se usó un molde de 200 nm para el ciclo 1 para aumentar la diversidad (se usó un molde de 300 nm para transcripciones de dRmY), y para ciclos posteriores se usó aproximadamente 50 nM, una dilución 1/10 de una reacción de PCR optimizada, usando condiciones descritas en el presente documento). Los moldes de transcripción de ADN preferidos se describen a continuación (en los que ARC254 y ARC256 transcriben en todas las condiciones de 2'-OMe y ARC255 transcribe en condiciones de rRmY).

ARC254:

**5'-CATCGATGCTAGTCGTAACGATCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNCGAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'**
(SEC ID N°: 51)

5 ARC255:

**5'-CATGCATCGCGACTGACTAGCCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'**
(SEC ID N°: 52)

ARC256:

10

**5'-CATCGATCGATCGATCGACAGCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'**
(SEC ID N°: 53)

15 En la transcripción de rN, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OH adenosín trifosfatos (ATP), 2'-OH
guanosín trifosfatos (GTP), 2'-OH citidín trifosfatos (CTP) y 2'-OH uridín trifosfatos (UTP). Los oligonucleótidos
modificados producidos usando las mezclas de transcripción de rN comprenden sustancialmente todos 2'-OH
20 adenosina, 2'-OH guanosina, 2'-OH citidina y 2'-OH uridina. En una realización preferida de transcripción de 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
25 nucleótidos de uridina son 2'-OH uridina. En una realización más preferida de transcripción de rN, 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'-OH citidina y al menos el 90 % de todos los
nucleótidos de uridina son 2'-OH uridina. En una realización más preferida de transcripción de rN, los
30 oligonucleótidos modificados que comprenden el 100 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH adenosina,
de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH guanosina, de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OH citidina y
de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OH uridina.

35 En las condiciones de transcripción de rRmY, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OH adenosín
trifosfatos, 2'-OH guanosín trifosfatos, 2'-O-metil citidín trifosfatos y 2'-O-metil uridín trifosfatos. Los oligonucleótidos
modificados producidos usando las mezclas de transcripción de rRmY comprenden sustancialmente todos 2'-OH
adenosina, 2'-OH guanosina, 2'-O-metil citidina y 2'-O-metil uridina. En una realización preferida, los oligonucleótidos
40 modificados resultantes comprende 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'-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 comprenden una secuencia en la que al menos el 90 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH
45 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'-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 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'-O-metil citidina y
50 el 100 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil uridina.

45 En condiciones de transcripción de dRmY, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-desoxi purina
trifosfatos y 2'-O-metil pirimidina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las condiciones de
transcripción de dRmY comprenden sustancialmente todos 2'-desoxipurinas y 2'-O-metil pirimidinas. En una
realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el
50 80 % de todos los nucleótidos de purina son 2'-desoxi purinas y al menos el 80 % de todos los nucleótidos de
pirimidina son 2'-O-metil pirimidinas. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes
comprenden una secuencia en la que el al menos el 90 % de todos los nucleótidos de purina son 2'-desoxi purinas y
al menos el 90 % de todos los nucleótidos de pirimidina son 2'-O-metil pirimidinas. En una realización más preferida,
los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que el 100 % de todos los nucleótidos
de purina son 2'-desoxi purinas y el 100 % de todos los nucleótidos de pirimidina son 2'-O-metil pirimidinas.

55

En condiciones de transcripción de rGmH, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OH guanosina trifosfatos, 2'-O-metil citidín trifosfatos, 2'-O-metil uridín trifosfatos y 2'-O-metil adenosín trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las condiciones de transcripción de rGmH comprende sustancialmente todos los 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 el 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 el 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.

En condiciones de transcripción de r/mGmH, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-O-metil adenosín trifosfato, 2'-O-metil citidín trifosfato, 2'-O-metil guanosín trifosfato, 2'-O-metil uridín trifosfato y 2'-OH guanosín trifosfato. Los oligonucleótidos modificados resultantes producidos usando las mezclas de transcripción r/mGmH comprenden sustancialmente todos 2'-O-metil adenosina, 2'-O-metil citidina, 2'-O-metil guanosina y 2'-O-metil uridina, en los 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 r/mGmH 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 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 el 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.

En condiciones de transcripción de fGmH, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-O-metil adenosín trifosfatos (ATP), 2'-O-metil uridín trifosfatos (UTP), 2'-O-metil citidín trifosfatos (CTP) y 2'-F guanosín trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las condiciones de transcripción de fGmH 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 el 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 el 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. 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.

En condiciones de transcripción de dAmB, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-desoxi adenosín trifosfatos (dATP), 2'-O-metil citidín trifosfatos (CTP), 2'-O-metil guanosín trifosfatos (GTP) y 2'-O-metil uridín trifosfatos (UTP). Los oligonucleótidos modificados producidos usando las condiciones de transcripción de dAmB 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 el 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 el 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 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.

5 En cada caso, los productos de transcripción pueden usarse después como la biblioteca en el proceso de SELEX™ para identificar aptámeros y/o para determinar un motivo conservado de secuencias que tienen especificidad de unión por una diana dada. Las secuencias resultantes están ya estabilizadas, eliminando esta etapa del proceso para llegar a una secuencia de aptámeros estabilizada y proporcionar un aptámero más altamente estabilizado como resultado. Otra ventaja del proceso de SELEX™ 2'-OMe es que las secuencias resultantes probablemente tengan
10 menos nucleótidos 2'-OH requeridos en la secuencia, posiblemente ninguno.

Como se describe posteriormente, pueden obtenerse rendimientos menores pero aún útiles de transcritos incorporando completamente nucleótidos 2'-OMe sustituidos en condiciones distintas de las condiciones optimizadas descritas anteriormente. Por ejemplo, las variaciones de las condiciones de transcripción anteriores incluyen:

15 La concentración de tampón HEPES puede variar de 0 a 1 M. La presente divulgación también contempla el uso de otros agentes tamponantes que tienen una pKa entre 5 y 10, por ejemplo sin limitación, tris(hidroximetil)aminometano.

20 La concentración de DTT puede variar de 0 a 400 mM. Los métodos también proporcionan el uso de otros agentes reductores, por ejemplo sin limitación, mercaptoetanol.

La concentración de espermidina y/o espermina puede variar de 0 a 20 mM.

25 La concentración de PEG-8000 puede variar del 0 al 50 % (p/v). Los métodos también proporcionan el uso de otro polímero hidrófilo, por ejemplo sin limitación, PEG de otro peso molecular u otros polialquilienglicoles.

La concentración de Triton X-100 puede variar del 0 al 0,1 % (p/v). Los métodos también proporcionan el uso de otros detergentes no iónicos, por ejemplo sin limitación, otros detergentes, incluyendo otros detergentes de Triton-X.

30 La concentración de MgCl₂ puede variar de 0,5 mM a 50 mM. La concentración de MnCl₂ puede variar de 0,15 mM a 15 mM. Tanto MgCl₂ como MnCl₂ deben estar presentes dentro de los intervalos descritos y en una realización preferida están presentes en una relación de aproximadamente 10 a aproximadamente 3 de MgCl₂:MnCl₂, preferentemente, la relación es de aproximadamente 3-5, más preferentemente, la relación es de aproximadamente
35 3 a aproximadamente 4.

La concentración de 2'-OMe NTP (cada NTP) puede variar de 51 μM a 5 mM.

La concentración de 2'-OH GTP puede variar de 0 μM a 300 μM.

40 La concentración de 2'-OH GMP puede variar de 0 a 5 mM.

El pH puede variar de pH 6 a pH 9. Los métodos pueden practicarse dentro del intervalo de pH de actividad de la mayoría de las polimerasas que incorporan nucleótidos modificados. Además, los métodos proporcionan el uso
45 opcional de agentes quelantes en la condición de reacción de transcripción, por ejemplo sin limitación EDTA, EGTA, y DTT.

Los aptámeros seleccionados que tienen la mayor afinidad y unión específica como se demuestra por ensayos biológicos como se describe en los ejemplos posteriores son productos terapéuticos adecuados para tratar
50 afecciones en las que la diana está implicada en la patogénesis.

Productos terapéuticos de aptámeros

Los aptámeros representan una clase prometedora de agentes terapéuticos actualmente en desarrollo preclínico y
55 clínico. Como los productos biológicos, por ejemplo, péptidos o anticuerpos monoclonales, los aptámeros son capaces de unirse específicamente con dianas moleculares y, mediante la unión, inhibir la función diana. Un aptámero típico es de 10-15 kDa de tamaño (es decir, 30-45 nucleótidos), se une con su diana con afinidad subnanomolar, y diferencia entre dianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, normalmente no se unirá con otras proteínas de la misma familia génica) (Griffin, *et al.* (1993), *Gene* 137(1): 25-31; Jenison, *et al.* (1998), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8(4): 265-79; Bell, *et al.* (1999), *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 35(9): 533-42; Watson, *et al.* (2000), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10(2): 63-75; Daniels, *et al.* (2002), *Anal. Biochem.* 305(2): 214-26; Chen, *et al.* (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(16): 9226-31; Khati, *et al.* (2003), *J. Virol.* 77(23): 12692-8; Vaish, *et al.* (2003), *Biochemistry* 42(29): 8842-51). Creados por un proceso de selección completamente *in vitro* (SELEX™) de oligonucleótidos de secuencia aleatoria, se han generado aptámeros frente a numerosas
65 proteínas de interés terapéutico, incluyendo factores de crecimiento, enzimas, inmunoglobulinas y receptores (Ellington y Szostak (1990), *Nature* 346(6287): 818-22; Tuerk y Gold (1990), *Science* 249(4968): 505-510).

Los aptámeros tienen varias características atractivas para su uso como productos terapéuticos. Además de alta afinidad y especificidad de diana, los aptámeros han mostrado poca o ninguna toxicidad o inmunogenicidad en ensayos convencionales (Wlotzka, *et al.* (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99(13): 8898-902). Se han optimizado varios aptámeros terapéuticos y han progresado a través de diversos estadios de desarrollo preclínico, incluyendo análisis farmacocinético, caracterización de la eficacia biológica en modelos de enfermedad celulares y animales, y evaluación de farmacología de seguridad preliminar (Reyderman y Stavchansky (1998), Pharmaceutical Research 15(6): 904-10; Tucker *et al.*, (1999), J. Chromatography B. 732: 203-212; Watson, *et al.* (2000), Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10(2): 63-75).

Es importante que las propiedades farmacocinéticas para todos los productos terapéuticos basados en oligonucleótidos, incluyendo aptámeros, se adapten para coincidir con la aplicación farmacéutica deseada. Aunque los aptámeros dirigidos contra dianas extracelulares no padecen dificultades asociadas con el suministro intracelular (como sucede con productos terapéuticos antisentido y basados en ARNi), dichos aptámeros deben ser capaces de distribuirse a órganos y tejidos diana, y permanecer en el cuerpo (no modificados) durante un periodo de tiempo coherente con el régimen de dosificación deseado. Trabajos tempranos sobre los productos terapéuticos basados en ácido nucleico han mostrado que, aunque los oligonucleótidos no modificados se degradan rápidamente por digestión con nucleasa, las modificaciones protectoras en la posición 2' del azúcar, y uso de estructuras de protección terminal invertidas, por ejemplo, [3'-3' dT], mejoran drásticamente la estabilidad de ácidos nucleicos *in vitro* e *in vivo* (Green, *et al.* (1995), Chem. Biol. 2(10): 683-95; Jellinek, *et al.* (1995), Biochemistry 34(36): 11363-72; Ruckman, *et al.* (1998), J. Biol. Chem. 273(32): 20556-67; Uhlmann, *et al.* (2000), Methods Enzymol. 313: 268-84). En algunas selecciones de SELEX (es decir, experimentos de SELEX o SELEXiones), los grupos de partida de ácidos nucleicos de los que se seleccionan aptámeros normalmente se preestabilizan por modificación química, por ejemplo mediante la incorporación de nucleótidos 2'-fluoropirimidina (2'-F) sustituidos, para potenciar la resistencia de los aptámeros frente a ataque de nucleasas. Se han desarrollado también aptámeros que incorporan nucleótidos 2'-O-metilpurina (2'-OMe purina) sustituidos mediante las etapas de modificación post SELEX o, más recientemente, permitiendo la síntesis de bibliotecas de secuencias aleatorias que contienen 2'-OMe como un componente integral del proceso de SELEX en sí mismo, como se ha descrito anteriormente.

Además de la eliminación por nucleasas, los productos terapéuticos oligonucleotídicos se someten a eliminación mediante filtración renal. Como tal, un oligonucleótido resistente a nucleasa administrado por vía intravenosa muestra una semivida *in vivo* de < 10 minutos, a no ser que pueda bloquearse la filtración. Esto puede conseguirse facilitando la distribución rápida del torrente sanguíneo a tejidos o aumentando el peso molecular aparente del oligonucleótido por encima del punto de corte de tamaño eficaz para el glomérulo. La conjugación de productos terapéuticos pequeños con un polímero de PEG (PEGilación), descrita posteriormente, puede alargar drásticamente los tiempos de residencia de los aptámeros en circulación, aumentando de este modo la frecuencia de dosificación y potenciando la eficacia contra dianas vasculares. Trabajos previos en animales han examinado las propiedades farmacocinéticas en plasma de aptámeros conjugados con PEG (Reyderman y Stavchansky (1998), Pharmaceutical Research 15(6): 904-10; Watson, *et al.* (2000), Anti-sense Nucleic Acid Drug Dev. 10(2): 63-75). La determinación de la extravasación de un producto terapéutico de aptámero, incluyendo productos terapéuticos de aptámeros conjugados con un resto modificador o que contienen nucleótidos modificados, y en particular la determinación del potencial de aptámeros o sus formas modificadas para acceder a tejidos enfermos (por ejemplo, sitios de inflamación, o el interior de los tumores) definirán mejor el espectro de las oportunidades terapéuticas para la intervención de aptámeros.

Los perfiles farmacocinéticos de las composiciones de aptámeros tienen "capacidad de ajuste" (es decir, la capacidad para modular la farmacocinética del aptámero). La capacidad de ajuste de la farmacocinética de aptámero se consigue, por ejemplo mediante la conjugación de restos modificadores (por ejemplo, polímeros de PEG) con el aptámero y/o la incorporación de nucleótidos modificados (por ejemplo, sustituciones 2'-fluoro y/o 2'-OMe) para alterar la composición química del ácido nucleico.

Además, la capacidad de ajuste de la farmacocinética de aptámeros se usa para modificar la biodistribución de un producto terapéutico de aptámero en un sujeto. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable alterar la biodistribución de un producto terapéutico de aptámero en un intento de dirigirse a un tipo particular de tejido o un órgano específico (o conjunto de órganos). En estas aplicaciones, el producto terapéutico de aptámero preferentemente se acumula en un tejido u órgano u órganos específicos. En otras aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable dirigirse a tejidos que presenten un marcador celular o un síntoma asociado con una enfermedad dada, lesión celular u otra patología anómala, de modo que el producto terapéutico de aptámero se acumule preferentemente en el tejido afectado. Por ejemplo, como se describe en la solicitud provisional relacionada USSN 60/550790, presentada el 5 de marzo de 2004 y titulada "Modulación Controlada de la Farmacocinética y Biodistribución de Productos Terapéuticos de Aptámeros", se usa la PEGilación de un producto terapéutico de aptámero (por ejemplo, PEGilación con un polímero de PEG de 20 kDa) para dirigirse a tejidos inflamados, de modo que el producto terapéutico de aptámero PEGilado se acumule preferentemente en tejido inflamado.

Los perfiles farmacocinético y de biodistribución de productos terapéuticos de aptámeros se determinan controlando diversos parámetros. Dichos parámetros incluyen, por ejemplo, la semivida ($t_{1/2}$), la eliminación del plasma (C1), el volumen de distribución (Vss), el área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC), la concentración en plasma o

suero observada máxima ($C_{m\acute{a}x}$), y el tiempo de residencia medio (MRT) de una composici3n de apt3mero. Como se usa en el presente documento, el t3rmino "AUC" se refiere al 3rea bajo la representaci3n de la concentraci3n en plasma de un producto terap3utico de apt3mero frente al tiempo despu3s de la administraci3n del apt3mero. El valor de AUC se usa para estimar la biodisponibilidad (es decir, el porcentaje de producto terap3utico de apt3mero administrado en circulaci3n despu3s de la administraci3n del apt3mero) y/o eliminaci3n total (C1) (es decir, la velocidad a la que el producto terap3utico de apt3mero se retira de la circulaci3n) de un producto terap3utico de apt3mero dado. El volumen de distribuci3n relaciona la concentraci3n en plasma de un producto terap3utico de apt3mero con la cantidad de apt3mero presente en el cuerpo. Cuanto mayor sea el V_{ss} , m3s apt3mero se encuentra fuera del plasma (es decir, m3s extravasaci3n).

Apt3meros de uni3n espec3fica a PDGF-VEGF y PDGF como productos terap3uticos de oncolog3a

Se exponen en el presente documento apt3meros que son capaces espec3ficamente de unirse con e inhibir diferentes isoformas de PDGF. Estos apt3meros, que incluyen apt3meros que se unen solamente a PDGF, apt3meros que se unen tanto a PDGF como a VEGF, y uno de los apt3meros anteriores que tiene un motivo CpG incorporado en el mismo, proporcionan una modalidad de baja toxicidad, segura y eficaz de inhibir la mayor parte de la progresi3n tumoral mediada por PDGF, incluyendo sin limitaci3n, glioblastomas, leucemia mielomonoc3tica cr3nica (CMML), dermatofibrosarcoma protuberante (DFSP), tumores del estroma gastrointestinal, (GIST) y otros sarcomas de tejidos blandos.

Los ejemplos de apt3meros de uni3n espec3fica con PDGF-VEGF y PDGF para su uso como productos terap3uticos de oncolog3a incluyen las siguientes secuencias:

Apt3meros de uni3n con PDGF:

ARC126: 5'-(5'-NH₂-dC-dA-dG-dG-dC-fU-dA-fC-mG- 3', SEC ID N^o: 1)-HEG-(5'-dC-dG-T-dA-mG-dA-mG-dC-dA-fU-fC-mA-3', SEC ID N^o: 2)-HEG-(5'-T-dG-dA-T-fC-fC-fU-mG-3'dT-3', SEC ID N^o: 3)-3'

en la que HEG = hexaetilenglicol amidita.

ARC127: 5'-[PEG 40K]-(5'-NH₂-dC-dA-dG-dG-dC-fU-dA-fC-mG- 3', SEC ID N^o: 1)-HEG-(5'-dC-dG-T-dA-mG-dA-mG-dC-dA-fU-fC-mA-3', SEC ID N^o: 2)-HEG-(5'-T-dG-dA-T-fC-fC-fU-mG-3'dT-3', SEC ID N^o: 3)-3'

en la que HEG = hexaetilenglicol amidita.

ARC240:
5'-[PEG 20K]-(5'-NH₂-dC-dA-dG-dG-dC-fU-dA-fC-mG- 3', SEC ID N^o: 1)-HEG-(5'-dC-dG-T-dA-mG-dA-mG-dC-dA-fU-fC-mA-3', SEC ID N^o: 2)-HEG-(5'-T-dG-dA-T-fC-fC-fU-mG-3'dT-3', SEC ID N^o: 3)-3'

en la que HEG = hexaetilenglicol amidita.

ARC308:
5'-[PEG 30K]-(5'-NH₂-dC-dA-dG-dG-dC-fU-dA-fC-mG- 3', SEC ID N^o: 1)-HEG-(5'-dC-dG-T-dA-mG-dA-mG-dC-dA-fU-fC-mA-3', SEC ID N^o: 2)-HEG-(5'-T-dG-dA-T-fC-fC-fU-mG-3'dT-3', SEC ID N^o: 3)-3'

en la que HEG = hexaetilenglicol amidita.

desoxiARC126:
5'-dCdAdGdGdCdTdAdCdGdCdGdTdAdGdAdGdCdAdTdCdAdTdGdAdTdCdCdTdG-[3T]-3' (SEC ID N^o: 8)

en la que "d" indica desoxinucle3tidos no modificados y "[3T]" es como se ha definido anteriormente.

ARC124:

5' CACAGGCTACGGCACGCTAGAGCATCACCATGATCCTGTG3'InvdT. (SEC ID N°: 11)

Aptámero de control mezclado:

ARC128: (ARC126 mezclado):

5'-(5'-NH₂-dC-dA-dG-fC-mG-fU-dA-fC-mG-3', SEC ID N°: 4)-HEG-(5'-dC-dG-T-dA-dC-dC-mG-dA-T-fU-fC-mA-3', SEC ID N°: 5)-HEG-(5'-T-dG-dA-dA-dG-fC-fU-mG-3'dT-3', SEC ID N°: 6)-3'

5

en la que HEG = hexaetilenglicol amidada.

Aptámero de unión con VEGF:

ARC245:

5'-mAmUmGmCmAmGmUmUmUmGmAmGmAmAmGmUmCmGmCmGmCmAmU-[3T]-3' (SEC ID N°: 7),

10

en la que "m" indica nucleótidos 2'-OMe y "[3T]" se refiere a un nucleótido de timidina invertido que está unido con el extremo 3' del oligonucleótido en la posición 3' del azúcar ribosa, por lo tanto el oligonucleótido tiene dos extremos 5' y es por lo tanto resistente a nucleasas que actúan en el extremo 3' hidroxilo.

15

Aptámeros multivalentes de unión con PDGF/VEGF:

TK.131.012.A: (SEC ID N°: 9)

5'dCdAdGdGdCdTdAdCdGmAmUmGmCmAmGmUmUmUmGmAmGmAmAmGmUmCmGmCmGmCmAmUdCdGdTdAdGdAdGdCdAdTdCdAdGdAdAdAdTdGdAdTdCdCdTdG[3T]-3'

20

en la que "m" indica nucleótidos 2'-OMe, "d" y "[3T]" son como se ha definido anteriormente.

TK.131.012.B: (SEC ID N°: 10)

5'dCdAdGdGdCdTdAdCdGmUmGmCmAmGmUmUmUmGmAmGmAmAmGmUmCmGmCmGmCmAdCdGdTdAdGdAdGdCdAdTdCdAdGdAdAdAdTdGdAdTdCdCdTdG-[3T]

25

en la que "m" y "[3T]" son como se ha definido anteriormente.

Otros aptámeros que se unen con PDGF y/o VEGF se describen posteriormente, por ejemplo, en la Tabla 2 y en el Ejemplo 12.

30

Se ha demostrado que la inhibición de la señalización de PDGF con antagonistas del receptor de moléculas pequeñas reduce la presión del líquido intersticial y aumenta la captación de productos quimioterapéuticos en tumores sólidos. Pietras *et al.* validaron la hipótesis de que PDGF-B está implicado en la IFP y que el bloqueo de la función de PDGF-B podría conducir a un aumento de la captación de productos quimioterapéuticos en tumores. (Pietras *et al.*, (2003), Cancer Cell vol. 3 p.439-443). Usando el modelo de carcinoma tiroideo de KAT-4, que tiene propiedades de señalización paracrina de PDGF conocidas, Pietras *et al.* demostraron que los tumores de KAT-4 expresaban receptores PDGF β en el estroma y que PDGF-B se unía con células KAT-4 *in vitro*. A continuación, Pietras *et al.* usaron el fármaco inhibidor de tirosina quinasa STI571 (GLEEVEC™) para bloquear la señalización de PDGF-B en tumores KAT-4 y mostraron que este tratamiento reducía significativamente la IFP tumoral *in vivo* lo que condujo a aumento de la captación de taxol. Sin embargo, ya que el STI571 se dirige a receptores tanto PDGF α como β , así como tirosina quinasas Kit, Abl y Arg, era imposible saber si el efecto de STI571 se debía al bloqueo de PDGF-B solamente. Esta ambigüedad se resolvió usando un aptámero altamente específico para bloquear PDGF-B en experimentos similares. El aptámero tiene una afinidad de 100 pM por PDGF-B y ninguna afinidad apreciable por la secuencia de PDGF-A. Como con STI571, el tratamiento de ratones de xenoinjerto de KAT-4 con aptámero de

40

PDGF-B conjugado con PEG redujo la IFP y aumentó drásticamente la captación tumoral de taxol. Resulta más importante que el tratamiento con aptámero potenció en gran medida la capacidad del taxol para inhibir el crecimiento tumoral. Además, se ha mostrado que un producto terapéutico de cáncer comercializado en la actualidad, el antagonista de receptor de PDGF GLEEVEC™ es eficaz en la reducción de la IFP tumoral y el aumento de la captación tumoral de citotoxinas cuando se usa en combinación con una citotoxina tal como taxol. Por lo tanto, los métodos y materiales de la presente se usan para inhibir la actividad biológica de PDGF-B y su etiología en el desarrollo de tumores y crecimiento potenciando la captación y eficacia de los productos quimioterapéuticos.

En otras palabras, los métodos de terapia de combinación de la presente invención que combinan aptámeros específicos de PDGF de la presente invención con agentes citotóxicos, es decir que combinan aptámeros específicos de PDGF con otras citotoxinas conocidas, proporcionan un método eficaz para suministrar fármacos específicamente en el sitio de los tumores, por la reducción selectiva de la IFP en vasos tumorales, lo que a su vez permite el aumento de la captación de citotoxinas en tumores a través de 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 por los métodos de la presente invención (Pietras *et al.*, (2003), Cancer Cell vol. 3 p.439-443).

Los aptámeros de PDGF de la presente invención pueden usarse en combinación con diversos agentes citotóxicos o citostáticos conocidos (de forma colectiva "citotóxicos") para reducir la IFP tumoral, y de este modo aumentar el suministro y captación tumoral de agentes citotóxicos para todos los tumores sólidos. Los agentes citotóxicos o citostáticos adecuados incluyen estabilizadores/desestabilizadores de tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos y agentes alquilantes de ADN u otros modificadores de ADN, incluyendo pero sin limitación paclitaxel (TAXOL™), docetaxel, irinotecán, topotecán, gemcitabina, epotilona, cisplatino, carboplatino, 5-fluoro-U, caliqueamicina, doxorubicina, metotrexato, AraC (citarabina), vinblastina, daunorubicina, oxaliplatino, ciclofosfamida, iflosamida, pharmarubicin, epirubicina, vinflunina, oblimersén sódico, perimetrexed, inhibidores de quinasa, incluyendo pero sin limitación quinasa receptora de EGF, quinasa receptora de VEGF, aurora quinasa, bien solos o bien en cualquier combinación de los mismos. Los aptámeros de PDGF de la presente invención pueden usarse en combinación con diversos agentes de dirección vascular conocidos en los que "agentes de dirección vascular" significa una molécula pequeña terapéutica (por ejemplo, irinotecán), un producto terapéutico proteico (por ejemplo, bevizumab) y/o un producto terapéutico oligonucleotídico (por ejemplo, moléculas antisentido, moléculas de ARNip) que modifica la red de vasculatura y neovasculatura existente que apoya el flujo sanguíneo y linfático al tumor. Los aptámeros de PDGF de la presente invención pueden usarse en combinación con un producto terapéutico conjugado que comprende un resto de unión o dirección, y un resto citotóxico, en el que el resto de unión o dirección es, pero sin limitación, un aptámero, anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación trastuzumab, rituximab, cetuximab, panitumumab, gemtuzumab, bevizumab y tositumomab, péptido, un agente de dirección vascular o compuesto de folato y en el que el resto citotóxico pertenece a una clase de compuestos que incluye pero sin limitación, estabilizadores/desestabilizadores de tubulina, antimetabolitos, inhibidores de la síntesis de purina, análogos de nucleósidos y agentes alquilantes de ADN, otros agentes modificadores de ADN o agentes alteradores vasculares (por ejemplo, flavonoides) solos o en cualquier combinación de los mismos. Los materiales y métodos de la presente invención proporcionan un medio más eficaz de administrar agentes quimioterapéuticos conocidos para inhibir la formación de tumores sólidos que da como resultado diversos cánceres incluyendo pero sin limitación cáncer colorrectal, pancreático, de mama, de pulmón, de próstata y ovárico.

Además, las composiciones de aptámeros de PDGF de la presente invención pueden usarse como agentes antiangiogénicos para inhibir la formación de la vasculatura tumoral dirigiéndose a pericitos. Como alternativa, las composiciones de aptámeros de PDGF de la presente invención pueden usarse en combinación con un antagonista de VEGF/VEGFR, tal como un aptámero específico para VEGF, para proporcionar un modo más eficaz de inhibir la angiogénesis tumoral que un producto terapéutico de aptámero de PDGF o producto terapéutico de antagonistas de VEGF/VEGFR solamente. Una ventaja de los agentes que se dirigen a PDGF-B y VEGF de la presente divulgación es que las composiciones terapéuticas no parecen mostrar ninguna actividad tirosina quinasa fuera de la diana, ya que son extremadamente específicas para su ligando diana, y no se diseñan para entrar en células para inducir su función biológica. Por el contrario, los productos terapéuticos de moléculas pequeñas inhibidoras de quinasa comercializados en la actualidad, por ejemplo GLEEVEC™, muestran alta actividad fuera de la diana. GLEEVEC™ se dirige a los receptores de tirosina quinasa tanto α como β además de las tirosinas quinasas BCR-Abl, C-kit y Arg. Se administran moléculas pequeñas inhibidoras de quinasa, tales como GLEEVEC™, a o cerca de su dosis tolerada máxima cuando se usan en el tratamiento de tumores sólidos. La toxicidad de GLEEVEC™ y otros inhibidores de tirosina quinasa (TKI) está limitada probablemente tanto por efectos secundarios relacionados con el mecanismo como efectos secundarios no relacionados con el mecanismo (fuera de la diana). Por lo tanto, la actividad fuera de la diana es un impedimento importante para el desarrollo de moléculas pequeñas inhibidoras de quinasas en general. Basándose en experimentos *in vivo* con ARC 127 (5'-[PEG 40K]-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3'-dT-3') y ARC308 (5'-[PEG 30K]-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3'-dT-3') no resultan evidentes efectos secundarios limitantes de la dosis. Son ventajas adicionales que las composiciones terapéuticas de aptámero de la presente invención pueden administrarse por vías intravenosa, subcutánea o intraperitoneal, lo que significa facilidad de administración. Cuando se comparan con productos terapéuticos de cáncer de anticuerpos monoclonales, los aptámeros no son inmunogénicos, por lo tanto la reacción al fármaco o resistencia al fármaco no son un problema.

Aptámeros para PDGF e isoformas de PDGF

Los materiales de la presente divulgación comprenden una serie de aptámeros de ácido nucleico 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 73, SEC ID N°: 77 a 81 y SEC ID N°: 85) que se unen específicamente con la proteína PDGF-B *in vitro* y que bloquean funcionalmente la actividad de PDGF-BB en ensayos *in vivo* y basados en células. Las secuencias de aptámeros anti PDGF-B de la presente invención 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 restos que contienen 2'F individuales. Se incorporaron restos que contenían 2'F en ARC 126 para aumentar la estabilidad en suero *in vitro* e *in vivo* del aptámero terapéutico bloqueando su degradación por endonucleasas y/o exonucleasas en suero. En un intento de reemplazar restos de nucleótidos que contienen 2'F potencialmente tóxicos en el aptámero anti PDGF-B ARC126, se ha identificado una nueva serie de aptámeros completamente sin 2'F. Los nuevos aptámeros de la presente invención conservan potente actividad antiproliferativa y de unión *in vitro*, y contienen nucleótidos 2' desoxi o 2'OMe sustituidos de origen natural. Estos nuevos aptámeros de la presente invención también conservan estabilidad en suero sustancial como se determina mediante resistencia a degradación con nucleasa en un ensayo de estabilidad *in vitro*, sin detectarse degradación durante hasta 48 horas.

Los productos terapéuticos de aptámeros de la presente invención tienen gran afinidad y especificidad por PDGF, isoformas de PDGF y receptor de PDGF reduciendo a la vez los efectos secundarios deletéreos de sustituciones de nucleótidos de origen no natural cuando los productos terapéuticos de aptámero se degradan en el cuerpo de pacientes o sujetos. Las composiciones terapéuticas que contienen los productos terapéuticos de aptámeros de la presente invención no tienen nucleótidos fluorados.

Materiales y métodos para aumentar la eficacia de los agentes antitumorales

Los materiales y métodos de la presente divulgación comprenden además métodos para aumentar la eficacia de agentes antitumorales mediante terapia doble con los aptámeros de la presente invención, concretamente ARC127 y ARC308. Además, los métodos han demostrado que los aptámeros específicos de PDGF-B, ARC127 (es decir, ARC126+PEG 40K) y ARC308 (es decir, ARC126+PEG 30K) son agentes antitumorales activos cuando se administran conjuntamente con irinotecán a ratones desnudos que portan el xenoinjerto tumoral LS174t colorrectal. El uso de los métodos terapéuticos de cáncer ha mostrado que tanto ARC127 como ARC308 son agentes no citotóxicos seguros cuando se administran por sí solos, pero en combinación con otros agentes citotóxicos, ARC127 y ARC308 potencian sus efectos antitumorales a través de un mecanismo nuevo de acción. Los métodos demuestran además que el aptámero ARC127 derivado de suero cuando se administra a ratones por vía parenteral, es decir por vía intravenosa, por vía subcutánea o por inyección intraperitoneal, conserva su actividad biológica completa.

Quimera de aptámero específica para PDGF-B y VEGF

Los materiales y métodos de la presente divulgación proporcionan además una quimera de aptámero bifuncional que se dirige tanto a PDGF-B como a VEGF. La quimera de aptámero PDGF-B-VEGF TK.131.12.A (SEC ID N°: 9) y TK.131.12.B (SEC ID N°: 10) permite la dirección simultánea de PDGF-B y VEGF para tratamiento del cáncer. El aptámero de PDGF-B usado en la molécula quimérica deriva de la secuencia de aptámero ARC127. El aptámero de VEGF que se usó en la molécula quimérica deriva de la secuencia de aptámero ARC245 (SEC ID N°: 7). La quimera de aptámero puede construirse a partir de cualquier conjunto de aptámeros de unión con PDGF-B y VEGF. La quimera de PDGF-B-VEGF es útil en el tratamiento de tumores sólidos dependientes de VEGF que también muestran un alto grado de neovascularización así como reclutamiento de pericitos para apoyar la vasculatura incipiente.

Datos antitumorales recientes del modelo de tumor de ratón pancreático RipTag sugieren que se confiere un mayor bloqueo del crecimiento tumoral cuando se emprenden terapia anti VEGF y anti PDGFR simultáneamente, que cuando se añade el agente anti VEGF o el agente anti PDGFR solo (Bergers *et al.*, (2003), J. Clin. Invest., 111:9, p. 1287-1295). Ya que la terapia anti PDGFR bloquea todos los acontecimientos de señalización mediados por receptor, puede esperarse que sus efectos no sean específicos. La quimera de PDGF-B-VEGF proporciona dirección a PDGF-B y VEGF precisa en los tumores.

Los productos terapéuticos de aptámeros tienen gran afinidad y especificidad por VEGF, y el receptor de VEGF reduciendo a la vez los efectos secundarios deletéreos de sustituciones de nucleótidos de origen no natural cuando los productos terapéuticos de aptámero se degradan en el cuerpo de pacientes o sujetos. Las composiciones terapéuticas de los productos terapéuticos de aptámero están libres de o tienen una cantidad reducida de nucleótidos fluorados.

Aptámeros que tienen motivos inmunoestimuladores

El reconocimiento de ADN bacteriano por el sistema inmunitario de vertebrados se basa en el reconocimiento de dinucleótidos CG no metilados en contextos de secuencia particulares ("motivos CpG"). Un receptor que reconoce dicho motivo es el receptor de tipo Toll 9 ("TLR 9"), un miembro de una familia de receptores de tipo Toll (-10

miembros) que participan en la respuesta inmunitaria innata reconociendo distintos componentes microbianos. El TLR 9 se une con secuencias de CpG oligodesoxinucleotídicas (ODN) no metiladas de una manera específica de secuencia. El reconocimiento de motivos CpG desencadena mecanismos de defensa que conducen a respuestas inmunitarias innatas y en última instancia adquiridas. Por ejemplo, la activación de TLR 9 en ratones induce la activación de células presentadoras de antígenos, regulación positiva de moléculas del MHC de clase I y II y expresión de moléculas coestimuladoras importantes y citocinas incluyendo IL-12 e IL-23. Esta activación potencia tanto directa como indirectamente la respuesta de linfocitos B y T, incluyendo la regulación positiva robusta de la citocina de TH1 IFN-gamma. En su conjunto, la respuesta a secuencias CpG conduce a: protección contra enfermedades infecciosas, respuesta inmunitaria mejorada a las vacunas, una respuesta eficaz contra el asma, y citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos mejorada. Por lo tanto, los ODN CpG pueden proporcionar protección contra enfermedades infecciosas, actuar como inmunoadyuvantes o productos terapéuticos de cáncer (monoterapia o en combinación con mAb u otras terapias) y pueden reducir el asma y la respuesta alérgica.

Pueden identificarse aptámeros que comprenden uno o más motivos CpG o generarse por diversas estrategias usando, por ejemplo, el proceso de SELEX™ descrito en el presente documento. En general, las estrategias pueden dividirse en dos grupos. En el primer grupo, las estrategias se dirigen a identificar o generar aptámeros que comprenden tanto un sitio de unión para dianas distintas de las que reconocen motivos CpG como un motivo CpG. Estas estrategias son de la siguiente manera: (a) realizar SELEX™ para obtener un aptámero para una diana específica (distinta de una diana que se sabe que se une con motivos CpG y tras la unión estimula una respuesta inmunitaria), preferentemente una diana en la que una respuesta inmunitaria reprimida es relevante para el desarrollo de la enfermedad, usando un grupo de oligonucleótidos en el que se ha incorporado un motivo CpG en cada miembro del grupo como, o como parte de, una región fija, por ejemplo, en la región aleatoria de los miembros del grupo; (b) realizar SELEX™ para obtener un aptámero para una diana específica (distinta de una diana que se sabe que se une con motivos CpG y tras la unión estimula una respuesta inmunitaria), preferentemente una diana en la que una respuesta inmunitaria reprimida es relevante para el desarrollo de la enfermedad, y después añadir un motivo CpG al extremo 5' y/o 3' o introducir por ingeniería genética 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 con motivos CpG y tras la unión estimula una respuesta inmunitaria), preferentemente una diana en la que durante la síntesis del grupo la relación molar de los diversos nucleótidos se desvía en una o más etapas de adición de nucleótidos de modo que la región aleatoria de cada miembro de grupo se enriquece 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 con motivos CpG y tras la unión estimula una respuesta inmunitaria), preferentemente una diana en la que una respuesta inmunitaria reprimida es relevante para el desarrollo de la enfermedad, e identificar los aptámeros que comprenden un motivo CpG.

En el segundo grupo, las estrategias se dirigen a identificar o generar aptámeros que comprenden un motivo CpG y/u otras secuencias que están unidas con los receptores para los motivos CpG (por ejemplo, TLR9 o los otros receptores de tipo toll) y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria. Estas estrategias son las siguientes: (i) realizar SELEX™ para obtener un aptámero para una diana que se sabe que se une con motivos CpG y tras la unión estimula una respuesta inmunitaria usando un grupo de oligonucleótidos en el que se ha incorporado un motivo CpG en cada miembro del grupo como, o como parte de, una región fija, por ejemplo, en la región aleatoria de los miembros del grupo; (ii) realizar SELEX™ para obtener un aptámero para una diana que se sabe que se une con motivos CpG y tras la unión estimula una respuesta inmunitaria y después añadir un motivo CpG al extremo 5' y/o 3' o introducir por ingeniería genética 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 con motivos CpG y tras la unión estimula una respuesta inmunitaria en la que durante la síntesis del grupo la relación molar de los diversos nucleótidos se desvía en una o más etapas de adición de nucleótidos de modo que la región aleatoria de cada miembro del grupo se enriquece en motivos CpG; (iv) realizar SELEX™ para obtener un aptámero para una diana que se sabe que se une con motivos CpG y tras la unión estimula una respuesta inmunitaria e identificar los aptámeros que comprenden un motivo CpG; y (v) realizar SELEX™ para obtener un aptámero para una diana que se sabe que se une con motivos CpG e identificar los aptámeros que, tras la unión, estimulan una respuesta inmunitaria que no comprende un motivo CpG.

Se ha identificado diversas clases diferentes de motivos CpG, dando como resultado cada una tras el reconocimiento una cascada de acontecimientos diferente, liberación de citocinas y otras moléculas y activación de ciertos tipos celulares. Véase, por ejemplo, CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects, *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20: 709-760. Se desvelan motivos inmunoestimuladores adicionales en las siguientes Patentes de Estados Unidos: 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 motivos CpG u otros motivos inmunoestimuladores pueden incorporarse en un aptámero. La elección de aptámeros depende la enfermedad o trastorno para tratar. Son motivos inmunoestimuladores preferidos los siguientes (mostrados en 5' a 3' de izquierda a derecha) en los que "r" designa una purina, "y" designa una pirimidina y "X" designa cualquier nucleótidos: AACGTTTCGAG (SEC ID N°: 85); AACGTT; ACGT, rCGy; rrCGyy, XCGX, XXCGXX y X₁X₂CGY₁Y₂ en la que X₁ es G o A, X₂ no es C, Y₁ no es G e Y₂ es preferentemente T. En los casos en los que se incorpora un motivo CpG en un aptámero que se une con una diana específica distinta de

5 una diana que se sabe que se une con motivos CpG y tras la unión estimula una respuesta inmunitaria (una “diana no de CpG”), el CpG se localiza preferentemente en una región no esencial del aptámero. Pueden identificarse regiones no esenciales de aptámeros por mutagénesis dirigida, análisis de delección y/o análisis de sustitución. Sin embargo, puede usarse cualquier localización que no interfiera significativamente con la capacidad del aptámero para unirse con la diana no CpG. Además de estar incluido en la secuencia del aptámero, el motivo CpG puede añadirse a uno o ambos de los extremos 5' y 3' o unirse de otro modo al aptámero. Puede usarse cualquier localización o medio de unión siempre que no se interfiera significativamente con la capacidad del aptámero para unirse con la diana no CpG.

10 Como se usa en el presente documento “estimulación de una respuesta inmunitaria” puede significar (1) la inducción de una respuesta específica (por ejemplo, la inducción de una respuesta Th1) o de la producción de ciertas moléculas o (2) la inhibición o supresión de una respuesta específica (por ejemplo, inhibición o supresión de la respuesta Th2) o de ciertas moléculas.

15 Pueden incorporarse o añadirse motivos CpG a un aptámero contra cualquier diana incluyendo, pero sin limitación: PDGF, IgE, IgE Fcε R1, TNFα, PSMA, CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, FcRIIB, BTLA, TIM-3, CD11b, CD-11c, BAFF, B7-X, CD19, CD20, CD25 y CD33.

20 Incorporando motivos CpG en aptámeros que se dirigen específicamente a tumores sólidos estos aptámeros pueden usarse para activar el sistema inmunitario mediante el reclutamiento de células presentadoras de antígenos que han captado material derivado del tumor, potenciar su maduración y migración a ganglios linfáticos locales y aumentar la sensibilización de linfocitos T específicos de tumor. Esto es especialmente relevante cuando los aptámeros suministran carga útil citotóxica y da como resultado muerte celular (tal como un aptámero PSMA que contiene motivos CpG). Dichos aptámeros que contienen motivos CpG también pueden inducir una respuesta de memoria específica de tumor (uso profiláctico). Además, los efectos de reducción de la IFP y bloqueo del reclutamiento de pericitos de un aptámero de PDGF-B combinados con la respuesta inmunitaria aumentada observada tras la administración de CpG representan una potente terapia para el cáncer. Por lo tanto, los aptámeros con motivos CpG incorporados, añadidos o incluidos representan una nueva clase de compuestos antineoplásicos de modo que cuando se administran pueden conducir a una reducción del volumen significativa del tumor mediante dos mecanismos: en primer lugar mediante la activación de linfocitos T específicos de tumor dentro del lecho tumoral y en segundo lugar, mediante la acción basada en el mecanismo pretendido del farmacóforo de aptámero.

Composiciones farmacéuticas

35 La invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen moléculas de aptámeros. En algunas realizaciones, las composiciones son adecuadas para su uso interno e incluyen una cantidad eficaz de un compuesto farmacológicamente activo de la invención, solo o en combinación, con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos son especialmente útiles porque tienen toxicidad muy baja, o no la tienen.

40 Pueden usarse composiciones de la invención para tratar o prevenir una patología, tal como una enfermedad o trastorno, o aliviar los síntomas de dicha enfermedad o trastorno en un paciente. Las composiciones de la invención son útiles para la administración a un sujeto que padece, o es propenso a, una enfermedad o trastorno que está relacionado con o deriva de una diana con la que se unen específicamente los aptámeros.

45 Por ejemplo, la diana es una proteína implicada en una patología, por ejemplo, la proteína diana provoca la patología. Por ejemplo, la diana es la implicación de PDGF en el desarrollo y progresión de tumores sólidos.

50 Pueden usarse composiciones de la invención en un método para tratar a un paciente o sujeto que tiene una patología. El método implica administrar al paciente o sujeto una composición que comprende aptámeros que se unen con una diana (por ejemplo, una proteína) implicada en la patología, de modo que la unión de la composición con la diana altera la función biológica de la diana, tratando de este modo la patología.

55 El paciente o sujeto que tiene una patología, por ejemplo, el paciente o sujeto tratado por los métodos de la presente invención puede ser un mamífero, o más particularmente, un ser humano.

En la práctica, los compuestos 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 con su receptor.

60 Un aspecto de la invención comprende una composición de aptámeros de la invención en combinación con otros tratamientos para el cáncer o trastornos relacionados con cáncer. La composición de aptámero de la invención puede contener, por ejemplo, más de un aptámero. En algunos ejemplos, una composición de aptámero de la invención, que contiene uno o más compuestos de la invención, se administra en combinación con otra composición útil tal como un agente antiinflamatorio, un inmunosupresor, un agente antiviral o similares. Además, los compuestos de la invención 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, las formas de dosificación disponibles en la actualidad de los agentes terapéuticos conocidos para su uso en dichas combinaciones serán adecuadas.

5 La "terapia de combinación" (o "coterapia") incluye la administración de una composición de aptámero de la invención y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico que se pretende que proporcione el efecto beneficioso de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero sin limitación, acción conjunta 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 (habitualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada).

15 Puede pretenderse, pero en general no se pretende, que la "terapia de combinación" abarque la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes monoterapéuticos separados que casualmente y de forma arbitraria dan como resultado las combinaciones de la presente invención. Se pretende que la "terapia de combinación" abarque administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, es decir, en la que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea. Puede conseguirse administración sustancialmente simultánea, por ejemplo, administrando al sujeto una única cápsula que tiene una relación fija de cada agente terapéutico o en múltiples cápsulas individuales para cada uno de los agentes terapéuticos.

20 Puede efectuarse administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico por cualquier vía apropiada incluyendo, pero sin limitación, vías tópicas, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de membrana mucosa. Los agentes terapéuticos pueden administrarse por la misma vía o por diferentes vías. 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 por vía tópica.

25 Como alternativa, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía tópica o todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por inyección. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos no es extremadamente crítica. La "terapia de combinación" también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos como se ha descrito anteriormente en combinación adicional con otros principios biológicamente activos. Cuando la terapia de combinación comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se consiga un efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en casos apropiados, se consigue aún el efecto beneficioso cuando el tratamiento no farmacológico está temporalmente separado de la administración de los agentes terapéuticos, quizás en días o incluso semanas.

30 Los compuestos de la invención y el otro agente farmacológicamente activo pueden administrarse a un paciente de forma simultánea, secuencial o en combinación. Se apreciará que cuando se usa una combinación de la invención, el compuesto de la invención y el otro agente farmacológicamente activo pueden estar en el mismo vehículo farmacéuticamente aceptable y por lo tanto administrarse de forma simultánea. Pueden estar en vehículos farmacéuticos separados tales como formas de dosificación oral convencionales que se toman simultáneamente. El término "combinación" se refiere además al caso en el que los compuestos se proporcionan en formas de dosificación separadas y se administran de forma secuencial.

35 Las composiciones terapéuticas o farmacológicas de la presente invención generalmente comprenderán una cantidad eficaz del componente o los componentes activos de la terapia, disueltos o dispersos en un medio farmacéuticamente aceptable. Los medios o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones terapéuticas de la presente invención.

40 La preparación de composiciones farmacéuticas o farmacológicas se conocerá por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Normalmente, dichas composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como soluciones líquidas o bien como suspensiones; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección, como comprimidos u otros sólidos para administración oral; como cápsulas de liberación temporalizada; o en cualquier otra forma usada actualmente, incluyendo colirios, cremas, lociones, pomadas, inhalantes y similares. El uso de formulaciones estériles, tales como lavados basados en solución salina, por cirujanos, médicos o trabajadores de cuidados sanitarios para tratar un área particular en el campo operativo puede ser también particularmente útil. Las composiciones también pueden suministrarse mediante microdispositivo, micropartícula o esponja.

Tras la formulación, se administraran productos terapéuticos de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea farmacológica eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación farmacológica y similares.

5 En este contexto, la cantidad de principio activo y volumen de composición para administrar dependen del animal hospedador para tratar. Las cantidades precisas del compuesto activo requeridas para la administración dependen del criterio del facultativo y son peculiares para cada individuo.

10 Se utiliza normalmente un volumen mínimo de una composición requerido para dispersar los compuestos activos. También son variables los regímenes adecuados para administración, pero se tipificarían administrando inicialmente el compuesto y controlando los resultados y proporcionando después dosis controladas adicionales a intervalos adicionales.

15 Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), el componente farmacológico 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 en la mezcla aglutinantes adecuados, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de aluminio magnésico, 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 arábica, tragacanto o alginato sódico, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato sódico, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, 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 de xantano, agar, ácido alginico o su sal sódica, o mezclas efervescentes, y similares. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

30 Las composiciones inyectables son preferentemente soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y se preparan provechosamente supositorios a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizadores, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan de acuerdo con métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen de aproximadamente 35 0,1 a 75 %, preferentemente de aproximadamente 1 a 50 %, del principio activo.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse en formas de dosificación orales tales como liberación temporalizada y comprimidos o cápsulas de liberación sostenida, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones.

40 Pueden prepararse composiciones líquidas, particularmente inyectables, 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 formar de este modo la solución o suspensión inyectable, adicionalmente, pueden formularse formas sólidas adecuadas para disolver en líquido antes de la inyección. Las composiciones inyectables son preferentemente soluciones o suspensiones isotónicas acuosas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizadores, humectantes o emulsionantes, promotores de la solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas.

50 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en forma intravenosa (tanto embolada como infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, todas usando formas bien conocidas por los expertos habituales en la materia farmacéutica. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, bien como soluciones líquidas o bien como suspensiones.

55 La administración inyectable parenteral se usa generalmente para inyecciones subcutáneas, intramusculares o intravenosas e infusiones. Adicionalmente, un enfoque para la administración parenteral emplea la implantación de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida, que asegura que se mantenga un nivel constante de dosificación, de acuerdo con la Patente de Estados Unidos N° 3.710.795.

60 Además, pueden administrarse compuestos preferidos para la presente invención en forma intranasal mediante el uso tópico de vehículos intranasales adecuados, o mediante vías transdérmicas, usando las formas de parches cutáneos transdérmicos bien conocidas por los expertos habituales en la materia. Para administrar en forma de un sistema de suministro transdérmico, la administración de dosificación será, por supuesto, continua en lugar de intermitente durante el régimen de dosificación. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, pomadas, 65 lociones, pulverizaciones de aerosol y geles, en las que la concentración del principio activo variaría de 0,01 % a 15 %, p/p o p/v.

5 Para composiciones sólidas, los excipientes incluyen usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato sódico, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y pueden usarse similares. El compuesto activo definido anteriormente, también puede formularse como supositorios usando, por ejemplo, polialquilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol, como el vehículo. En algunas realizaciones, se preparan provechosamente supositorios a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

10 Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de suministro de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de diversos fosfolípidos, que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, se hidrata una película de componente lipídico con una solución acuosa de fármaco para formar una capa lipídica que encapsula el fármaco, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.262.564. Por ejemplo, las moléculas de aptámero descritas en el presente documento pueden proporcionarse como un complejo con un compuesto lipófilo o compuesto no inmunogénico, de alto peso molecular construido usando métodos conocidos en la técnica. Se proporciona un ejemplo de complejos asociados con ácido nucleico en la Patente de Estados Unidos N° 6.011.020.

15 Los compuestos de la presente invención también pueden acoplarse con polímeros solubles como vehículos farmacológicos dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxiethylspanamidofenol o polietileno oxidopolisina sustituido con restos de palmitoílo. Además, los compuestos de la presente invención pueden acoplarse con una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, caprolactona poliépsilon, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de hidrogeles en bloque reticulados o anfipáticos.

20 Si se desea, la composición farmacéutica para administrar también puede contener cantidades menores de sustancias adyuvantes no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH y otras sustancias tales como por ejemplo, acetato sódico y trietanolamina oleato.

25 El régimen de dosificación que utiliza los compuestos se selecciona de acuerdo con diversos factores incluyendo tipo, especie, edad, peso, sexo y condición médica del paciente; la gravedad de la afección para tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto particular o sal del mismo empleado. Un médico o veterinario experto habitual puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz del fármaco requerida para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

30 Las dosificaciones orales de la presente invención, cuando se usen para los efectos indicados, variarán entre aproximadamente 0,05 a 5000 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. Los niveles en plasma eficaces de los compuestos de la presente invención varían de 0,002 mg a 50 mg por kg de peso corporal por día.

35 Los compuestos de la presente invención 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.

40 Modulación de farmacocinética y biodistribución de productos terapéuticos de aptámeros

45 La presente divulgación proporciona materiales y métodos para afectar a la farmacocinética de composiciones de aptámeros, y, en particular, la capacidad para ajustar (es decir, la "capacidad de ajuste") la farmacocinética de aptámeros. La capacidad de ajuste de la farmacocinética de aptámero se consigue mediante la conjugación de restos modificadores con el aptámero y/o la incorporación de nucleótidos modificados para alterar la composición química del ácido nucleico. La capacidad de ajustar la farmacocinética de aptámero se usa en la mejora de aplicaciones terapéuticas existentes o, como alternativa, en el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en situaciones antineoplásicas o de cuidados agudos cuando puede desearse eliminación rápida de fármacos o inactivación, es deseable reducir los tiempos de residencia de los aptámeros en la circulación. Como alternativa, en otras aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, terapias de mantenimiento cuando se desea circulación sistémica de un producto terapéutico, puede ser deseable aumentar los tiempos de residencia de aptámeros en circulación.

50 Además, la capacidad de ajuste de la farmacocinética de aptámeros se usa para modificar la biodistribución de un producto terapéutico de aptámero en un sujeto. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable alterar la biodistribución de un producto terapéutico de aptámero en un intento de dirigirlo a un tipo particular de tejido o un órgano específico (o conjunto de órganos). En estas aplicaciones, el producto terapéutico de aptámero se acumula preferentemente en un tejido u órgano u órganos específicos. En otras aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable dirigirse a tejidos que presentan un marcador celular o un síntoma asociado con una enfermedad dada, lesión celular u otra patología anómala, de modo que el producto terapéutico de aptámero se acumule preferentemente en el tejido afectado. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, se usa la PEGilación de un producto terapéutico de aptámero (por ejemplo, PEGilación con un polímero de PEG de 20 kDa)

para dirigirse a tejidos inflamados, de modo que el producto terapéutico de aptámero PEGilado se acumule preferentemente en tejido inflamado.

Los perfiles farmacocinético y de biodistribución de productos terapéuticos de aptámeros (por ejemplo, conjugados de aptámero o aptámeros que tienen química alterada, tales como nucleótidos modificados) se determinan controlando diversos parámetros. Dichos parámetros incluyen, por ejemplo, la semivida ($t_{1/2}$), la eliminación del plasma (C1), el volumen de distribución (Vss), el área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC), la concentración en suero o plasma observada máxima ($C_{m\acute{a}x}$), y el tiempo de residencia medio (MRT) de una composición de aptámero. Como se usa en el presente documento, el término "AUC" se refiere al área bajo la representación de la concentración en plasma de un producto terapéutico de aptámero frente al tiempo después de la administración del aptámero. El valor de AUC se usa para estimar la biodisponibilidad (es decir, el porcentaje de producto terapéutico de aptámero administrado en la circulación después de la administración del aptámero) y/o eliminación total (C1) (es decir, la velocidad a la que se retira el producto terapéutico de aptámero de la circulación) de un producto terapéutico de aptámero dado. El volumen de distribución relaciona la concentración en plasma de un producto terapéutico de aptámero con la cantidad de aptámero presente en el cuerpo. Cuanto mayor sea el Vss, más aptámero se encontrará fuera del plasma (es decir, más extravasación).

Las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución de oligonucleótidos antisentido que contienen fosforotioato, que se eliminan rápidamente de la circulación, y se distribuyen en tejidos (donde se produce eliminación lentamente, como resultado de la degradación metabólica) se describen en la técnica: (véase por ejemplo, Srinivasan e Iversen (1995), *J. Clin. Lab. Anal.* 9(2): 129-37; Agrawal y Zhang (1997), *Ciba Found. Symp.* 209: 60-75, análisis 75-8; Akhtar y Agrawal (1997), *Trends Pharmacol. Sci.* 18(1): 12-8; Crooke (1997), *Adv. Pharmacol.* 40: 1-49; Grindel, *et al.* (1998), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8(1): 43-52; Monteith y Levin (1999), *Toxicol. Pathol.* 27(1): 8-13; Peng, *et al.* (2001), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 11(1): 15-27). Estudios tempranos que implican oligonucleótidos antisentido han explorado los efectos de diversas químicas de conjugación en la farmacocinética y biodistribución, con el objetivo último de aumentar el suministro de moléculas antisentido a sus sitios de acción dentro de células o dentro de ciertos tipos tisulares *in vivo* (Antopolsky, *et al.* (1999), *Bioconjug. Chem.* 10(4): 598-606; Zubin, *et al.* (1999), *FEBS Lett.* 456(1): 59-62; Astriab-Fisher, *et al.* (2000), *Biochem. Pharmacol.* 60(1): 83-90; Lebedeva, *et al.* (2000), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50(1): 101-19; Manoharan (2002), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 12(2): 103-28). Por ejemplo, se ha indicado que la conjugación con colesterol aumenta la semivida en circulación de oligonucleótidos antisentido, más probablemente mediante asociación con lipoproteínas del plasma, y promoviendo la captación hepática (de Smidt, *et al.* (1991), *Nucleic Acids Res.* 19(17): 4695-4700). Trabajos tempranos que implican oligonucleótidos antisentido han indicado que las interacciones de unión con proteínas no específicas desempeñan un papel importante en la pérdida rápida de oligonucleótidos antisentido que contienen fosforotioato de la circulación y distribución a tejidos (véase por ejemplo, Srinivasan y Iversen (1995), *J. Clin. Lab. Anal.* 9(2): 129-37; Agrawal y Zhang (1997), *Ciba Found. Symp.* 209: 60-75, análisis 75-8; Akhtar y Agrawal (1997), *Trends Pharmacol. Sci.* 18(1): 12-8; Crooke (1997), *Adv. Pharmacol.* 40: 1-49; Grindel, *et al.* (1998), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8(1): 43-52; Monteith y Levin (1999), *Toxicol. Pathol.* 27(1): 8-13; Peng, *et al.* (2001), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 11(1): 15-27).

A diferencia de los oligonucleótidos antisentido, los aptámeros son generalmente más largos (30-40 frente a 10-20 nucleótidos), poseen diferentes tipos de modificaciones químicas (modificaciones de azúcares, por ejemplo, 2'-F, 2'-O-Me, 2'-NH₂, frente a modificaciones de cadena principal), y asumen estructuras terciarias complejas que son más resistentes a degradación. Los aptámeros son, en muchos sentidos, estructuralmente más similares a las formas tridimensionales de proteínas globulares que a los ácidos nucleicos. Dadas estas diferencias considerables, la disposición *in vivo* de los aptámeros no es fácilmente predecible a partir de los resultados antisentido.

Más recientemente, también se han explorado péptidos de suministro para transportar macromoléculas polares grandes, incluyendo oligonucleótidos, a través de membranas celulares como un medio para aumentar *in vivo* el intervalo para aplicación de productos terapéuticos antisentido y otros. Los ejemplos de estos conjugados incluyen un fragmento de 13 aminoácidos (Tat) de la proteína Tat del VIH (Vives, *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.* 272(25): 16010-7), una secuencia de 16 aminoácidos derivada de la tercera hélice de la proteína homeótica antenapedia (Ant) de *Drosophila* (Pietersz, *et al.* (2001), *Vaccine* 19(11-12): 1397-405), y péptidos cortos, de carga positiva, permeables para células compuestos de poliarginina (Arg₇) (Rothbard, *et al.* (2000), *Nat. Med.* 6(11): 1253-7; Rothbard, *J et al.* (2002), *J. Med. Chem.* 45(17): 3612-8). Por ejemplo, el péptido TAT se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.804.604 y 5.674.980.

La presente divulgación proporciona materiales y métodos para modular, de una manera controlada, la farmacocinética y biodistribución de composiciones de aptámeros estabilizadas *in vivo* conjugando un aptámero con un resto modulador tal como una molécula pequeña, péptido o grupo terminal polimérico o incorporando nucleótidos modificados en un aptámero. La farmacocinética y biodistribución de conjugados de aptámeros en muestras biológicas se cuantifican de forma radiométrica y por un ensayo de captura de sondas doble basado en hibridación con lectura fluorescente ligada a enzimas. Como se describe en el presente documento, la conjugación de un resto modificador y/o alteración la composición química de un nucleótido o nucleótidos altera aspectos fundamentales del tiempo de residencia de aptámeros en circulación y su distribución a tejidos.

Los aptámeros se conjugan con diversos restos modificadores, tales como, por ejemplo, polímeros de alto peso molecular, por ejemplo, PEG, péptidos, por ejemplo, Tat, Ant y Arg₇, y moléculas pequeñas, por ejemplo, compuestos lipófilos tales como colesterol. Como se muestra en el presente documento, un aptámero de composición mixta que contenía modificaciones estabilizadoras tanto 2'-F como 2'-OMe persistió significativamente más tiempo en el torrente sanguíneo que una composición completamente 2'-O-metilada. Entre los conjugados preparados de acuerdo con los materiales y métodos de la presente divulgación, las propiedades *in vivo* de los aptámeros se alteraron más profundamente por la formación de complejos con grupos de PEG. Por ejemplo, la formación de complejos del producto terapéutico de aptámero 2'-F y 2'-OMe modificado mixto con un polímero PEG de 20 kDa obstaculizó la filtración renal y promovió la distribución de aptámeros a tejidos tanto sanos como inflamados. Además, el conjugado de aptámero-polímero de PEG de 20 kDa demostró ser casi tan eficaz como un polímero de PEG de 40 kDa en la prevención de la filtración renal de aptámeros. Aunque un efecto de la PEGilación era en la eliminación de aptámeros, la exposición sistémica prolongada proporcionada por la presencia de un resto de 20 kDa también facilitó la distribución del aptámero a tejidos, particularmente los de órganos altamente perfundidos y los que estaban en el sitio de inflamación. El conjugado de polímero de PEG de 20 kDa-aptámero (ARC120) dirigió la distribución del aptámero al sitio de inflamación, de modo que el aptámero PEGilado se acumuló preferentemente en tejido inflamado. En algunos casos, el conjugado de aptámero PEGilado de 20 kDa fue capaz de acceder al interior de células, tales como, por ejemplo, células de riñón.

En general, los efectos en la farmacocinética del aptámero y la distribución tisular producidos por restos modificadores de bajo peso molecular, incluyendo colesterol y péptidos permeables para células fueron menos pronunciados que los producidos como resultado de PEGilación o modificación de los nucleótidos (por ejemplo, una composición química alterada). Un aptámero conjugado con colesterol mostró una eliminación del plasma más rápida en relación con un aptámero no conjugado, y un gran volumen de distribución, lo que sugiere algún grado de extravasación del aptámero. Este resultado parece contradecir los datos publicados que demuestran la capacidad de un marcador de colesterol para prolongar significativamente la semivida en plasma de un oligonucleótido antisentido (de Smidt *et al.*, (1991), *Nucleic Acids Res.* 19(17): 4695-4700). Sin desear quedar ligado a la teoría, los resultados proporcionados en el presente documento pueden sugerir que las asociaciones mediadas por colesterol con lipoproteínas del plasma, que se ha postulado que se produce en el caso del conjugado antisentido, se impiden en el contexto particular de la estructura plegada de conjugado de colesterol-aptámero y/o se relacionan con el aspecto de la naturaleza lipófila del grupo de colesterol. Como el colesterol, la presencia de un marcador peptídico de Tat promovió la eliminación del aptámero del torrente sanguíneo, apareciendo niveles comparativamente altos de conjugado en los riñones a las 48 horas. Otros péptidos (por ejemplo, Ant, Arg₇) que se ha indicada en la técnica que median en el paso de macromoléculas a través de membranas celulares *in vitro*, no pareció promover la eliminación de aptámero de la circulación. Sin embargo, como Tat, el conjugado de Ant se acumuló significativamente en los riñones en relación con otros aptámeros. Aunque sin pretender quedar ligado a la teoría, es posible que la presentación desfavorable de los restos modificadores peptídicos de Ant y Arg₇ en el contexto de aptámeros plegados de forma tridimensional *in vivo* alterara la capacidad de estos péptidos para influir en las propiedades del transporte de aptámeros.

Antes de la invención descrita en el presente documento, se sabía poco con respecto a la farmacocinética y biodistribución de oligonucleótidos con una composición química 2'-OMe (Tavitian, *et al.* (1998), *Nat. Med.* 4(4): 467-71). Por varias razones, la incorporación de sustituciones 2'-OMe es un medio particularmente atractivo para estabilizar aptámeros frente al ataque de nucleasas. Un atributo es la seguridad: 2'-O-metilación se conoce como una modificación química de origen natural y abundante en ARN ribosómico y celular eucariota. Se estima que los ARNr humanos contienen aproximadamente cien azúcares 2'-O-metilados por ribosoma (Smith y Steitz (1997), *Cell* 89(5): 669-72). Por lo tanto, se espera que las composiciones de aptámero que incorporan sustituciones 2'-OMe no sean tóxicas. Apoyando esta visión, los estudios *in vitro* e *in vivo* indican que los nucleótidos 2'-OMe no se polimerizan fácilmente por ADN polimerasas humanas (α o γ), o por ADN primasa humana, y por lo tanto presentan un riesgo bajo para la incorporación en ADN genómico (Richardson, *et al.* (2000), *Biochem. Pharmacol.* 59(9): 1045-52; Richardson, *et al.* (2002), *Chem. Res. Toxicol.* 15(7): 922-6). Adicionalmente, desde una perspectiva de coste de los bienes, el precio por gramo para la síntesis de oligonucleótidos que contienen 2'-OMe es menor que el precio por gramo para ARN que contienen tanto 2'-F como 2'-OH.

Se realizó una comparación de un aptámero de composición mixta 2'-F/2'-OMe y aptámeros conjugados *in vivo* para determinar la eliminación del plasma. El aptámero de ensayo no conjugado que incorpora químicas estabilizadoras tanto 2'-F como 2'-OMe, es típico de los aptámeros de la generación actual ya que muestra un alto grado de estabilidad frente a nucleasa *in vitro* e *in vivo*. En comparación con el aptámero de composición mixta 2'-F/2'-OMe, el aptámero no modificado presentó pérdida rápida del plasma (es decir, eliminación rápida del plasma) y una rápida distribución a tejidos, principalmente al riñón.

Pueden realizarse ensayos para determinar si la naturaleza hidrófoba de un aptámero completamente 2'-OMe modificado hace al oligonucleótido más propenso a asociaciones no específicas con un componente del plasma o celular (como sucede con los oligonucleótidos antisentido). Además, pueden realizarse experimentos para definir las propiedades de unión a proteína de aptámeros 2'-OMe modificados. Aunque sin pretender quedar ligado a la teoría, se detectaron niveles de aptámero todo 2'-O-metil sustituido de longitud completa sobre el fondo en varios tejidos, riñón, hígado y bazo, incluso a las 48 horas después de la dosificación, posiblemente debido a la extrema robustez

del aptámero completamente 2'-OMe frente a la digestión con nucleasa. En un ejemplo, de forma coherente con su perfil de eliminación del plasma y distribución al riñón, un aptámero completamente 2'-OMe se eliminó rápidamente a través de la orina.

5 Cuando se expresaron como porcentaje de dosis administrada, todos los aptámeros o conjugados examinados en el presente documento mostraron niveles significativos de distribución al riñón, hígado y tracto gastrointestinal. Cuando se corrigieron con respecto a peso de órgano/tejido, las mayores concentraciones normalizadas para la masa de los aptámeros se vieron en órganos altamente perfundidos (riñones, hígado, bazo, corazón, pulmones) e inesperadamente en ganglios linfáticos mediastinales. Ya que los aptámeros están biodisponibles (hasta el 80 %) después de inyección subcutánea (Tucker *et al.*, (1999), J. Chromatography B. 732: 203-212), se espera que tengan acceso a dianas en el sistema linfático mediante esta vía de administración. El acceso fácil a los vasos linfáticos mediante dosificación intravenosa es interesante desde el punto de vista del desarrollo de productos terapéuticos de aptámeros para indicaciones de enfermedades infecciosas tales como VIH/SIDA. Por lo tanto, los productos terapéuticos de aptámero conjugados con restos modificadores y aptámeros que tienen químicas alteradas (por ejemplo, incluyendo nucleótidos modificados) serán útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas tales como VIH/SIDA.

De forma coherente con su farmacocinética en plasma potenciada, la concentración de aptámero PEGilado de 20 kDa detectada en órganos altamente perfundidos fue mayor que la de otros aptámeros que se ensayaron. Como una tendencia general, las concentraciones de aptámeros medidas en los riñones se redujeron con el tiempo, con la excepción del aptámero PEGilado de 20 kDa, en el que las concentraciones permanecieron aproximadamente constantes a lo largo del tiempo. Por el contrario, en el hígado, las concentraciones de todos los aptámeros permanecieron aproximadamente constantes, excepto por el aptámero PEGilado de 20 kDa, cuyos niveles se redujeron con el tiempo. Estas diferencias pueden entenderse con respecto a la semivida en plasma extendida del conjugado de PEG de 20 kDa y su captación aumentada en órganos altamente perfundidos. Aunque uno de los efectos de la formación de complejos con un resto modificador de PEG de 20 kDa fue retardar la filtración renal del conjugado de aptámero, las concentraciones comparativamente altas del conjugado de PEG de 20 kDa medidas en órganos bien perfundidos, en relación con otros aptámeros o conjugados, sugirieron que la PEGilación puede modular la distribución de aptámero a tejidos, así como promover la semivida en plasma extendida ($t_{1/2}$). Como se describe en el presente documento, el conjugado de aptámero PEGilado de 20 kDa moduló la distribución del aptámero a los tejidos. El nivel del aptámero PEGilado de 20 kDa detectado en tejidos inflamados fue mayor que para los otros aptámeros que se ensayaron y, en algunos casos, el aptámero fue capaz de acceder al interior de las células (por ejemplo, células de riñón).

Aunque sin pretender quedar ligado a la teoría, se especula que la residencia prolongada en el torrente sanguíneo aumenta la exposición del aptámero conjugado a tejidos, lo que conduce a captación potenciada, que es más pronunciada en el caso de órganos altamente perfundidos y en el caso de tejidos inflamados. La presencia del aptámero en sangre residual puede contribuir a, pero es poco probable que explique completamente, los niveles aumentados del conjugado de aptámero de 20 kDa en órganos perfundidos y tejidos inflamados mostrados en el presente documento. La distribución potenciada de aptámero PEGilado a órganos perfundidos y tejidos inflamados representa extravasación, como se sugiere por experimentos en ratones dosificados con conjugado de PEG de 20 kDa tritiado en el que se vio señal de [^3H] en células tanto del hígado como del riñón (véase Ejemplos proporcionados posteriormente). Trabajos tempranos en los productos terapéuticos de aptámero se centraron principalmente en el desarrollo de aptámeros en complejo con especies de PEG de mayor peso molecular (40 kDa) en un intento de evitar la filtración renal (Reyderman y Stavchansky (1998), Pharmaceutical Research 15(6): 904-10; Tucker *et al.*, (1999), J. Chromatography B. 732: 203-212; Watson, *et al.* (2000), Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10(2): 63-75; Carrasquillo, *et al.* (2003), Invest: Ophthalmology Vis. Sci. 44(1): 290-9). La presente invención indica que la formación de complejos con un polímero de PEG más pequeño, por ejemplo, de 20 kDa, protege suficientemente los fármacos basados en aptámero de la filtración renal para muchas indicaciones terapéuticas. Los PEG más pequeños (por ejemplo, restos de PEG de 10 kDa a 20 kDa) también proporcionan los beneficios colaterales de facilidad de síntesis y coste reducido de bienes, en comparación con PEG mayores.

Ácidos nucleicos derivatizados con PEG

55 La derivatización de ácidos nucleicos con polímeros no inmunogénicos de alto peso molecular tiene el potencial de alterar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de ácidos nucleicos haciéndolos agentes terapéuticos más eficaces. Los cambios favorables en la actividad pueden incluir resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, filtración reducida a través de los riñones, exposición reducida al sistema inmunitario y distribución alterada del producto terapéutico a través del cuerpo.

60 Las composiciones de aptámeros pueden derivatizarse con restos de polialquilenglicol (PAG). Se encuentran ejemplos de ácidos nucleicos derivatizados con PAG en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004180360. Los polímeros típicos incluyen poli(etilenglicol) (PEG), también conocido como poli(etilen óxido) (PEO) y polipropilenglicol (incluyendo poliisopropilenglicol). Adicionalmente, pueden usarse copolímeros aleatorios o en bloque de diferentes alquilen óxidos (por ejemplo, etilen óxido y propilen óxido) en muchas aplicaciones. En su forma más común, un polialquilenglicol, tal como PEG, es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos

hidroxilo: HO-CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-OH. Este polímero, alfa, omega-dihidroxilpoli(etilenglicol), también puede representarse como HO-PEG-OH, en la que se entiende que el símbolo PEG representa la siguiente unidad estructural: -CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂- en la que n normalmente varía de aproximadamente 4 a aproximadamente 10.000.

5 Como se muestra, la molécula de PEG es difuncional y en ocasiones se denomina "PEG diol". Las partes 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 con otros compuestos en sitios reactivos en el compuesto. Dichos PEG dioles activados se denominan en el presente documento PEG biactivados. Por ejemplo, los restos terminales de PEG diol se han funcionalizado como carbonato éster activo para reacción selectiva con restos amino por sustitución de los restos hidroxilo relativamente no reactivos, -OH, con restos de éster succinimidil activo de N-hidroxi succinimida.

15 En muchas aplicaciones, es deseable recubrir la molécula de PEG en un extremo con un resto esencialmente no reactivo de modo que la molécula de PEG sea monofuncional (o esté monoactivada). En el caso de productos terapéuticos proteicos que generalmente presentan múltiples sitios de reacción para PEG activados, los PEG activados bifuncionales conducen a reticulación extensiva, produciendo agregados escasamente funcionales. Para generar PEG monoactivos, un resto hidroxilo en el extremo de la molécula de PEG diol se sustituye normalmente con un resto final de metoxi no reactivo, -OCH₃. El otro extremo no recubierto de la molécula de PEG normalmente se convierte en un resto de extremo reactivo que puede activarse para la unión en un sitio reactivo en una superficie o una molécula tal como una proteína.

25 Los PAG son polímeros que normalmente tienen las propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos, falta de toxicidad y falta de inmunogenicidad. Un uso de los PAG es unir covalentemente el polímero con moléculas insolubles para hacer el "conjugado" de molécula de PAG resultante soluble. Por ejemplo, se ha mostrado que el fármaco insoluble en agua paclitaxel, cuando se acopla con PEG, se hace soluble en agua. Greenwald, *et al.*, J. Org. Chem., 60: 331-336 (1995). Los conjugados de PAG se usan con frecuencia no solamente para potenciar la solubilidad y estabilidad sino también para prolongar la semivida en circulación en sangre de las moléculas.

30 Los compuestos polialquilados son normalmente de entre 5 y 80 kD de tamaño. Otros compuestos de PAG son de entre 10 y 80 kD de tamaño. Otros compuestos de PAG son de entre 10 y 60 kD de tamaño. Por ejemplo, un polímero de PAG puede ser de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 u 80 kD de tamaño. Dichos polímeros pueden ser lineales o ramificados.

35 A diferencia de los productos terapéuticos proteicos expresados biológicamente, los productos terapéuticos de ácido nucleico normalmente se sintetizan químicamente a partir de nucleótidos monoméricos activados. Pueden prepararse conjugados de ácido nucleico-PEG incorporando el PEG usando la misma síntesis monomérica por iteraciones. Por ejemplo, pueden incorporarse PEG activados por conversión con una forma de fosoramidita en síntesis de oligonucleótidos de fase sólida. Como alternativa, la síntesis de oligonucleótidos puede completarse con incorporación específica de sitio de un sitio de unión de PEG reactivo. Más habitualmente esto se ha conseguido mediante la adición de una amina primaria libre en el extremo 5' (incorporada usando una fosoramidita modificadora en la última etapa de acoplamiento de síntesis de fase sólida). Usando esta enfoque, se combina un PEG reactivo (por ejemplo, uno que está activado de modo que reaccione y forme un enlace con una amina) con el oligonucleótido purificado y la reacción de acoplamiento se lleva a cabo en solución.

45 La capacidad de conjugación con PEG para alterar la biodistribución de un producto terapéutico se relaciona con varios factores incluyendo el tamaño aparente (por ejemplo, como se mide con respecto al radio hidrodinámico) del conjugado. Se sabe que los conjugados mayores (>10 kDa) bloquean más eficazmente la filtración a través del riñón y que aumentan en consecuencia 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 del 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 lugar de la eliminación a través de los riñones).

55 La producción de PEG de alto peso molecular (>10 kDa) puede ser difícil, ineficaz y cara. Como una vía para la síntesis de conjugados de ácido nucleico-PEG de alto peso molecular, los trabajos previos se han centrado en la generación de PEG activados de mayor peso molecular. Un método para generar dichas moléculas implica la formación de un PEG activado o ramificado en el que dos o más PEG se unen con un núcleo central que porta el grupo activado. Las partes terminales de estas moléculas de PEG de mayor peso molecular, es decir, los restos de hidroxilo (-OH) relativamente no reactivos, pueden activarse, o convertirse en restos funcionales, para la unión de uno o más de los PEG con otros compuestos en sitios reactivos del compuesto. Los PEG activados ramificados tendrán más de dos extremos terminales, y en casos en los que se han activado dos o más extremos terminales, dichas moléculas de PEG de mayor peso molecular activadas se denominan en el presente documento PEG multiactivadas. En algunos casos, no todos los extremos en una molécula de PEG ramificada están activados. En casos en los que se activan dos extremos cualesquiera de una molécula de PEG ramificada, dichas moléculas de PEG se denominan PEG biactivadas. En algunos casos en los que solamente un extremo en una molécula de PEG

ramificada está activado, dichas moléculas de PEG se denominan monoactivadas. Como un ejemplo de este enfoque, se ha descrito PEG activado preparado por la unión de dos monometoxi PEG con un núcleo de lisina que se activa posteriormente para la reacción (Harris *et al.*, Nature, vol. 2: 214-221, 2003).

5 La presente divulgación proporciona otra vía rentable para la síntesis de conjugados de ácido nucleico-PEG de alto peso molecular (preferentemente, aptámero) incluyendo ácidos nucleicos PEGilados de forma múltiple. La presente divulgación también abarca oligonucleótidos multiméricos ligados a PEG, por ejemplo, aptámeros dimerizados. La presente invención se refiere a composiciones de alto peso molecular en las que un resto estabilizador de PEG es un enlazador que separa diferentes partes de un aptámero, por lo tanto el PEG se conjuga dentro de una única
10 secuencia de aptámero, de modo que la disposición lineal de las composiciones de aptámero de alto peso molecular es, por ejemplo, ácido nucleico-PEG-ácido nucleico-PEG-ácido nucleico.

Las composiciones de alto peso molecular incluyen las que tienen un peso molecular de al menos 10 kD. Las composiciones normalmente tienen un peso molecular entre 10 y 80 kD de tamaño. Las composiciones de alto peso
15 molecular son de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 u 80 kD de tamaño.

Un resto estabilizador es una molécula, o parte de una molécula, que mejora las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de las composiciones de aptámero de alto peso molecular. En algunos casos, un resto estabilizador es una molécula o parte de una molécula que pone dos o más aptámeros, o dominios de aptámero, en
20 proximidad, o proporciona libertad rotacional general reducida de las composiciones de aptámeros de alto peso molecular. Un resto estabilizador puede ser un polialquilenglicol, tal como polietilenglicol, que puede ser lineal o ramificado, un homopolímero o un heteropolímero. Otros restos estabilizadores incluyen polímeros tales como ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Los oligonucleótidos también pueden ser restos estabilizadores; dichos oligonucleótidos estabilizadores pueden incluir nucleótidos modificados y/o enlaces modificados, tales como
25 fosforotioatos. Un resto estabilizador puede ser una parte integral de una composición de aptámero, es decir, está unido covalentemente con el aptámero.

Las composiciones de la divulgación incluyen composiciones de aptámeros de alto peso molecular en las que dos o más restos de ácido nucleico están conjugados covalentemente con al menos un resto de polialquilenglicol. Los
30 restos de polialquilenglicol actúan como restos estabilizadores. En composiciones en las que un resto de polialquilenglicol está unido covalentemente en uno de los extremos con un aptámero, de modo que el polialquilenglicol se une con los restos de ácido nucleico juntos en una molécula, se dice que el polialquilenglicol es un resto enlazador. En dichas 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
35 nucleico-PEG-ácido nucleico. Otro ejemplo es una disposición lineal de: ácido nucleico - PEG - ácido nucleico - PEG - ácido nucleico.

Para producir el conjugado de ácido nucleico-PEG-ácido nucleico, el ácido nucleico se sintetiza originalmente de modo que porte un único sitio reactivo (por ejemplo, está monoactivado). En una realización preferida, este sitio reactivo es un grupo amino introducido en el extremo 5' terminal por la adición de una fosforamida modificadora como la última etapa en la síntesis de fase sólida del oligonucleótido. Después de la desprotección y purificación del oligonucleótido modificado, se reconstituye a alta concentración en una solución que minimiza la hidrólisis espontánea del PEG activado. En una realización preferida, la concentración de oligonucleótido es 1 mM y la solución reconstituida contiene tampón NaHCO₃ 200 mM, pH 8,3. La síntesis del conjugado se inicia por la adición
40 por etapas, lenta, de PEG bifuncional altamente purificado. En una realización preferida, el PEG diol está activado en ambos extremos (biactivado) por derivatización con succinimidil propionato. Después de la reacción, el conjugado de ácido nucleico-PEG se purifica por electroforesis en gel o cromatografía líquida para separar especies completamente, parcialmente y no conjugadas. Pueden unirse múltiples moléculas de PAG concatenadas (por ejemplo, como copolímeros aleatorios o en bloque) o cadenas de PAG más pequeñas para conseguir diversas longitudes (o pesos moleculares). Pueden usarse enlazadores no de PAG entre cadenas de PAG de diversas
45 longitudes.

Las modificaciones de 2'-O-metilo, 2'-fluoro estabilizan el aptámero frente a nucleasas y aumentan su semivida *in vivo*. El recubrimiento 3'-3'-dT también aumenta la resistencia a exonucleasas. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos 5.674.685; 5.668.264; 6.207.816; y 6.229.002.
50

Derivatización con PAG de un ácido nucleico reactivo

Pueden prepararse conjugados de PAG-ácido nucleico-PAG de alto peso molecular por reacción de un PEG activado monofuncional con un ácido nucleico que contiene más de un sitio reactivo. En una realización, el ácido nucleico es birreactivo, o biactivado, y contiene dos sitios reactivos: un grupo 5'-amino y un grupo 3'-amino introducido en el oligonucleótido mediante síntesis de fosforamida convencional, por ejemplo: 3'-5'-di-PEGilación como se ilustra en la Figura 22. En relaciones alternativas, pueden introducirse sitios reactivos en posiciones internas, usando por ejemplo, la posición 5 de pirimidinas, la posición 8 de purinas o la posición 2' de ribosa como
60 sitios para la unión de aminas primarias. En dichas realizaciones, el ácido nucleico puede tener varios sitios activados o reactivos y se dice que está activado de forma múltiple. Después de la síntesis y purificación, el

oligonucleótido modificado se combina con el PEG monoactivado en condiciones que promueven la reacción selectiva con los sitios reactivos oligonucleotídicos minimizando al mismo tiempo la hidrólisis espontánea. En la realización preferida, se activa monometoxi-PEG con succinimidil propionato y la reacción acoplada se lleva a cabo a pH 8,3. Para conducir la síntesis del PEG bisustituido, se proporciona PEG con exceso estequiométrico en relación con el oligonucleótido. Después de la reacción, el conjugado de ácido nucleico-PEG se purifica por electroforesis en gel o cromatografía líquida para separar especies completamente, parcialmente y no conjugadas.

Los dominios de enlace también pueden tener uno o más restos de polialquilenglicol unidos a los mismos. Dichos PAG pueden ser de diversas longitudes y pueden usarse en combinaciones apropiadas para conseguir el peso molecular deseado de la composición.

El efecto de un enlazador particular puede verse influido tanto por su composición química como por su longitud. Un enlazador que es demasiado largo, demasiado corto o forma interacciones estéricas y/o iónicas desfavorables con la diana impedirá la formación de un complejo entre el aptámero y la diana. Un enlazador, 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 lo tanto, es con frecuencia necesario optimizar las composiciones del enlazador y sus longitudes para maximizar la afinidad de un aptámero por una diana.

Habiéndose descrito ahora la invención por medio de una descripción escrita, los expertos en la materia reconocerán que la invención puede practicarse en diversas realizaciones y que la descripción anterior y ejemplos posteriores son para fines de ilustración y no limitación de las reivindicaciones a continuación.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Síntesis y conjugación de aptámeros a gran escala

ARC126 (5'-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-IMG-(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 un recubrimiento dT invertido 3' para potenciar la estabilidad frente al ataque de nucleasas. Pueden conjugarse restos de PEG con ARC 126 usando un modificador del extremo 5' amino para reacciones de conjugación posteriores. Se realizaron síntesis usando química de fosoramidita de 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 con PDGF, se sintetizó usando el mismo método.

ARC126 se conjugó con varios restos de PEG: PEG 20 kDa (ARC240, (5'-[PEG 20 K]-SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3' dT-3')); PEG 30 kDa (ARC308, (5'-[PEG 30 K]-SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3' dT-3')); PEG 40 kDa (ARC127, (5'-[PEG 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 de carbonato sódico 100 mM, pH 8,5, y se hizo reaccionar durante 1 hora con un exceso molar de 2,5 de mPEG-SPA (PM 20 kDa) o mPEG2-NHS éster (PM 40 kDa) (Shearwater Corp., Huntsville, AL) y un exceso molar de 3,5 (durante 24 horas) de mPEG-nPNC (PM 30 kDa) (NOF Corporation, Tokio, Japón) en volúmenes iguales de acetonitrilo. Los productos resultantes se purificaron después por HPLC de intercambio iónico en una columna Super Q 5PW de 50 ml (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA) usando NaCl acuoso como eluyente. Los oligonucleótidos conjugados se desalaron después en una columna Amberchrom CG300S de 100 ml (Tosoh) usando un gradiente de agua/acetonitrilo. Los conjugados de aptámeros se liofilizaron para su almacenamiento.

Para poder usar ARC 127 en modelos animales, fue necesario ensayar la calidad del material sintetizado con respecto a niveles de endotoxinas. El contenido de endotoxinas de ARC127 sintetizado se determinó usando el ensayo de LAL (realizado por Nelson Labs, AZ). Los resultados para ensayos de endotoxina se muestran en la Tabla 1 posterior. Las cantidades detectadas de endotoxina estuvieron por debajo de la norma ISO para soluciones de irrigación estériles (0,5 UE/ml), es decir, menores que los niveles permitidos para administración IV. Esto indicó que las preparaciones de ARC 126 y ARC 127 eran estériles y que era posible continuar a modelos de eficacia animal.

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

Muestra	Dilución	Endotoxina detectada	Recuperación máxima
ARC126	1:10	2,5 UE/ml y 0,52 UE/mg	73 %
	1:100	2,8 UE/ml y 0,58 UE/mg	103 %
	1:200	2,5 UE/ml y 0,52 UE/mg	104 %

ARC127	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 %
ARC128	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 %

Se realizaron síntesis a pequeña escala de las variantes del aptámero ARC-126 desfluoradas en el sintetizador de ADN Expedite 8909 de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando química de fosforamidita de fase sólida convencional y los protocolos de acoplamiento recombinados por el distribuidor. Los aptámeros se escindieron y se desprotegieron añadiendo 250 μ l de hidróxido de amonio/metilamina acuosa al 40 % (1:1) al soporte de columna y se colocaron en un bloque de calentamiento a 65 °C durante 30 minutos. Los aptámeros se secaron en un Speed Vac (Savant), después se resuspendieron en 200 μ l de diH₂O. Se realizó purificación de HPLC en una HPLC WAVE de Transgenomic (Omaha, NE). Las columnas usadas para intercambio iónico fueron la DNAPAC (Dionex, Sunnyvale, CA) y Resource (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Tampón A: fosfato sódico 25 mM/acetronitrilo 25 %; Tampón B: fosfato sódico 25 mM/perclorato sódico 400 mM/acetronitrilo 25 %, se usó un gradiente de 0-80 % de B. Las fracciones purificadas se agruparon después y se secaron en un Speed Vac y se resuspendieron en 200 μ l de diH₂O.

EJEMPLO 2

Estudios de estabilidad con aptámeros fluorados

Se compararon ARC126 y ARC127 recién sintetizados de forma interna con ARC126 y ARC 127 que se sintetizaron por Proligo (Boulder, CO) y se habían almacenado y liofilizado durante 2 años a -20 °C (aptámeros legados).

ARC127 sintetizado de forma interna y ARC 127 legado se pasaron sobre una columna de HPLC de intercambio iónico para su análisis. La Figura 5A es un rastro de un análisis de HPLC de intercambio iónico de ARC 127 recién sintetizado y legado que muestra que después de 2 años de almacenamiento liofilizado a -20 °C, no se detectó relativamente ninguna degradación del ARC 127 legado.

Los aptámeros ARC 126 y ARC 127 legados y almacenados a -20 °C durante dos años también se ensayaron con respecto a potencia, y se compararon con ARC126 y ARC127 recién sintetizados de forma interna usando el ensayo de proliferación de células 3T3 (Ejemplo 3). La Figura 5B muestra resultados del ensayo basado en células con respecto a potencia que demuestran que incluso después de la liofilización y almacenamiento a -20 grados durante 2 años, los aptámeros legados eran tan potentes como ARC126 y ARC127 recién sintetizados de forma interna.

EJEMPLO 3

Optimización de composición y secuencia de variantes de ARC126

La secuencia y estructura secundaria del aptámero anti PDGF designado ARC126 se muestra en la Figura 6A. La secuencia y estructura secundaria de derivados de ARC 126 en los que se han reemplazado los nucleótidos con sustituyentes 2'-fluoro se muestran en la Figura 6B. Los bucles en los extremos de los dos tallos internos son espaciadores de polietilenglicol 6 (PEG-6) y los nucleótidos modificados se representan por dA = desoxiadenosina; dG = desoxiguanosina; mA = 2'-O-metiladenosina; dT = desoxitimidina; dC = desoxicitosina; mT = 2'-O-metilimidina; mG = 2'-O-metilguanosa; mC = 2'-O-metilcitosina; [3'T] = desoxitimidina invertida; fC = 2'-fluorocitosina; y fU = 2'-fluorouridina.

Como se muestra en la Figura 6A, la composición de 29 nucleótidos de ARC126 contiene siete restos 2'-fluoro (tres 2'-fluorouridinas y cuatro 2'-fluorocitosinas). Debido a consideraciones que incluyen la genotoxicidad de productos de degradación, se optimiza la composición de ARC126 con el objetivo de modificar la composición de secuencia para retirar todos o la mayoría de los restos 2'-fluoro sin comprometer la potencia o estabilidad de la molécula existente. Una forma de retirar los restos 2'-fluoro consistió en la sustitución sencilla con los siete restos 2'-fluoro de restos desoxi. Dicha variante toda de ADN de ARC 126, designada ARC299 (SEC ID N°: 42-PEG-SEC ID N°: 43-PEG-SEC ID N°: 44, en la que PEG = espaciador PEG-6), se sintetizó y ensayó en ensayos de unión bioquímica *in vitro* y proliferación basada en células. Estos experimentos mostraron que la sustitución sencilla con todos los restos 2'-fluoro de restos desoxi en la composición de 29 unidades de ARC 126 indujo inestabilidad en los tallos central y superior, lo que condujo a actividad/potencia significativamente reducida.

Después de la síntesis, estas variantes de composición se ensayaron en ensayos de unión bioquímica *in vitro* y proliferación basada en células descritos en el presente documento. Estos experimentos mostraron una amplia serie de afinidades en ensayos de unión de competición *in vitro* y una serie similarmente amplia de actividades en ensayos de proliferación basados en células (los resultados se describen posteriormente). Las variantes de composición que mostraron los mayores niveles de afinidad de unión y actividad de ensayo basado en células se ejemplifican por la serie ARC513-516, mostrada en la Figura 6B. La Figura 6B muestra las variantes de composición óptima de ARC126: ARC5 (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'). A partir de la Figura 6B, todas las variantes de composición óptima están comprendidas por un tallo extendido, en relación con ARC 126, en dos pares de bases, y en los tallos superiores, un conjunto de sustituciones puntuales comunes de restos 2'-fluoro por 2'-O-metilo así como los restos 2'-O-metilo preexistentes de ARC126. Las variantes de composición ARC513-516 difieren solamente en dos aspectos: (1) la identidad desoxi o 2'-fluoro de los tres restos de guanosina 3' terminal en el tallo central; y (2) la identidad desoxi o 2'-O-metilo del resto de citosina en la parte superior del tallo central en el extremo 3'.

La afinidad de unión *in vitro* de las variantes de composición óptima para PDGF se muestra en la Figura 7A. Los datos mostrados en la figura derivaron de un ensayo de unión competitiva en el que la concentración indicada de aptámero competidor, no marcado, se valoró en reacciones separadas frente a una cantidad fija (<0,1 nM) de aptámero ARC126 radiomarcado con ³²P en un tampón que contenía una cantidad fija (0,1 nM) de la diana afin del aptámero (PDGF-BB; PeptoTech, Rocky Hill, NJ). ARC126 se radiomarcó en el extremo 5' por incubación con γ -³²P-ATP (MP Biomedicals, Irvine, CA) y polinucleótido quinasa (New England Biolabs ("NEB"), Beverly, MA). Se llevaron a cabo reacciones de unión en solución salina tamponada con fosfato (Cellgro, Herndon, VA) que contenía albúmina de suero bovino (NEB) 0,2 mg/ml y ARNt 0,02 mg/ml (Sigma, St. Louis, MO). Las reacciones se equilibraron durante un periodo de 15-30 minutos a temperatura ambiente, después se filtraron a través de un sándwich de membranas de nitrocelulosa (membrana Protran, Perkin-Elmer, Boston, MA) y nylon (Hybond membrane, Amersham, Piscataway, NJ) para separar el aptámero unido a diana del aptámero libre. Análisis autorradiográficos posteriores de las membranas de filtro correspondientes a cada concentración de aptámero no marcado revelaron el alcance del desplazamiento competitivo de ³²P-ARC126 por aptámero no marcado. Los datos se muestran en la Figura 7 en la que ARC 128 ((5'-(SEC ID N°: 4)-HEG-(SEC ID N°: 5)-HEG-(SEC ID N°: 6) -3')) representa una variante de secuencia mezclada y por lo tanto inactiva de ARC 126.

La Figura 7B muestra datos del ensayo de proliferación basado en células 3T3 *in vitro* que muestran la actividad de algunas variantes de composición de ARC 126. Se sembraron células 3T3, una línea celular de fibroblastos de rata (ATCC, Manassas, VA), a 3.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos un día antes del comienzo del ensayo en 100 μ l de DMEM/FCS 10 %. Al día siguiente, las células se lavaron una vez con DMEM puro y después se añadieron 75 μ l de DMEM/FCS 0,8 % a cada pocillo. Después se añadieron 25 μ l de PDGF-BB (PeptoTech, Rocky Hill, NJ) a una concentración final de 50 ng/ml +/- variantes de ARC126 (6 puntos, concentración final 0-200 nM) a cada pocillo. Las células se incubaron durante 3 días. Después de la incubación se añadieron 10 μ l de MTT (Promega, Madison, WI) a cada pocillo y se incubó durante 1,5 horas adicionales. Después se retiraron los medios, se añadieron 200 μ l de isopropanol (2-propanol) a cada pocillo, las células se resuspendieron exhaustivamente y se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas de 96 pocillos. Como se muestra en la Figura 7B, resulta 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' 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') es similar.

Optimización de las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución *in vivo*. Además de la optimización de la composición de secuencia de ARC 126 con respecto a afinidad de unión con diana y actividad de ensayo basada en células *in vitro*, es deseable optimizar la semivida, $t_{1/2}$, farmacocinética (PK) *in vivo* y propiedades de biodistribución de la composición o las composiciones de secuencia óptimas para los aptámeros anti PDGF descritos previamente. Esta modulación de las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución de una composición de aptámeros puede conseguirse (véase documento U.S. Ser N° 10/718.833, presentado el 21 de noviembre de 2003 y documento U.S. Ser. N° 60/550.790, presentado el 5 de marzo de 2004) mediante 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 de -2 kD a 100 kD, teniendo los PEG típicos pesos moleculares de 2 kD, 10 kD, 20 kD, 30 kD, 40 kD, 50 kD).

Para establecer la viabilidad del uso de una composición de secuencia de aptámero PEGilada dada, fue necesario confirmar que la PEGilación potencial no interfería significativamente con la actividad del aptámero en los ensayos de unión *in vitro* y de proliferación basada en células. La Figura 8A muestra curvas del ensayo de unión de competición para NH₂-ARC 126 (ARC126 5'-amina-modificado, sin PEG) y dos variantes que están conjugadas 5' con grupos de PEG de 30 kD (ARC308) y 40 kD (ARC 127), respectivamente. Se realizaron ensayos de unión competitiva y se analizaron como se ha descrito en el presente documento excepto que se usó NH₂-ARC 126 marcado con 3'-³²P en lugar de 5'-³²P-ARC126 (la secuencia de nucleótidos de ARC 126 incorpora una timidina

inversa en el extremo 3' terminal, que es un sustrato para la reacción de radiomarcage catalizada por la polinucleótido quinasa).

La Figura 8A es una representación de los datos de ensayo de unión de competición para ARC126 y dos variantes que están conjugadas 5' con los grupos de PEG de 30 kD (ARC308) y 40 kD (ARC 127). La Figura 8B muestra datos del ensayo de proliferación basado en células 3T3 *in vitro* para ARC 126 en función de la conjugación con el grupo de PEG 5' (ARC126+30 kD = ARC308 y ARC126+ PEG 40 kD = ARC 127). Los datos mostrados en la Figura 8B demuestran que la conjugación 5' de ARC126 con grupos de PEG de 30 kD y 40 kD parece conducir a una ligera reducción de la actividad *in vitro* del aptámero, el efecto de la presencia de los grupos de PEG es menor del doble en relación con el aptámero no PEGilado, ARC126. Los datos mostrados en la Figura 8B también demuestran que la conjugación 5' de ARC126 con grupos de PEG de 30 kD y 40 kD no reducen significativamente la actividad *in vitro* del aptámero en relación con la composición de ARC126.

La Figura 9A muestra el perfil farmacocinético *in vivo* de ARC126 en función de la conjugación con el grupo de PEG 5'. Se realizaron estudios en ratones CD-1 como se describe en el Ejemplo 10 (Charles River Labs, Wilmington, MA). A partir de la figura, resulta evidente que la semivida, $t_{1/2}$, de eliminación terminal está fuertemente afectada por el tamaño del grupo de PEG 5' conjugado con el aptámero.

Los datos farmacocinéticos (PK) mostrados en la Figura 9A se sometieron análisis no compartimentalizado (NCA) usando el paquete de software convencional en la industria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). La Tabla 3 a continuación enumera los parámetros farmacocinéticos (PK) *in vivo* derivados de NCA primario para ARC126 + grupos de PEG de 20 kD (ARC240), +30 kD (ARC308) y +40 kD (ARC127) después de administración intravenosa (IV) a 10 mg/kg en ratones. Los datos mostrados en la Tabla 3 demuestran que la semivida de eliminación farmacocinética, $t_{1/2}$, *in vivo* de ARC126 se modula ≥ 4 veces cambiando el tamaño del grupo de PEG 5' conjugado con el aptámero afectado por el tamaño del grupo PEG 5' conjugado con el aptámero de 20 kD a 40 kD. La Figura 9B muestra el perfil farmacocinético *in vivo* de ARC127 (ARC126 + PEG 40 kD) después de 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 9B se sometieron a análisis no compartimentalizado (NCA) usando el paquete de software convencional en la industria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

Tabla 3. Análisis no compartimentalizado farmacocinético de conjugados 5' de ARC126

	PEG	C _{máx} , nM	AUC, nM·h	t _{máx} (h)	MRT (h)	t _{1/2} (h)	V _{ss} (ml/kg)
ARC240	20 K	34317	0,5	39277	1,16	0,94	0,3
ARC308	30 K	27659	1,0	64867	2,14	1,67	0,3
ARC127	40 K	60964	2,0	344356	5,08	6,84	0,1

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

La Tabla 4 a continuación enumera los parámetros farmacocinéticos (PK) *in vivo* derivados de NCA primario para ARC126 + PEG 40 kD en función de la vía de administración a 10 mg/kg en ratones. Los datos farmacocinéticos (PK) mostrados en la Figura 9B se sometieron a análisis no compartimentalizado (NCA) usando el paquete de software convencional en la industria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

Tabla 4. Perfil farmacocinético de ARC127 (ARC126 + PEG 40 kD)

	C _{máx} , nM	t _{máx} (h)	AUC (h·nM)	MRT (h)	t _{1/2} (h)	V _s (l/kg)	biodisponibilidad, F
IV	29711,6	2	229686,8	6,573	8,602	0,053	1,000
IP	12756,0	8	143605,5	11,231	7,856	0,078	0,625
SC	3176,7	8	55030,91	16,632	9,176	0,238	0,240

Después de la administración intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) y subcutánea (SC) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones.

A partir de los datos mostrados en la Figura 9B, resultan evidentes dos asuntos principales: (1) la farmacocinética de ARC127 (ARC126 + PEG 40 kD) después de la administración intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones está presente a una concentración en plasma de ~1 μ M a 24 horas 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 es aún suficientemente alta (~24 %) para asegurar su consideración para aplicaciones clínicas.

Como un ensayo secundario tanto de la farmacocinética en plasma como de la bioactividad *in vivo* de ARC 127 (ARC126 + PEG 40 kD), se usó el ensayo de unión de competición descrito anteriormente en referencia a la Figura 7 para ensayar las mismas muestras de plasma usadas para generar los datos mostrados en la Figura 9B. Se

prepararon diluciones en serie 1:10 de muestras de plasma en solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X) y se mezclaron con una concentración fija de ^{32}P -ARC126, después se añadieron a PDGF-BB humano. La concentración final de PDGF en cada ensayo fue de 0,1 mM, y la concentración final de ^{32}P -ARC126 < 0,1 nM. En este experimento, las muestras de plasma se analizaron por comparación con una curva patrón generada con muestras de concentraciones de ARC127 conocidas en PBS 1X. Por comparación con los patrones de referencia, pudo calcularse la concentración eficaz de aptámero activo en cada muestra de plasma. La concentración eficaz de aptámero activo, como se calcula usando los resultados del análisis del ensayo de unión de competición de las muestras de PK en plasma, se muestran en la Figura 9C. La Figura 9C muestra el perfil de bioactividad de ARC126 + PEG 40 kD después de la administración intravenosa (IV) a un nivel de dosis de 10 mg/kg en ratones. Este análisis *ex vivo* proporciona por lo tanto la verificación de que (1) el aptámero estaba presente y activo en el plasma del modelo de ratón a t=48 horas después de la dosis; y (2) las concentraciones en plasma calculadas a partir del ensayo de farmacocinética basado en fluorescencia son correctas.

EJEMPLO 4

Reactividad cruzada entre especies de ARC126 y ARC127

Se realizaron estudios para determinar a qué isoformas de PDGF se uniría ARC 126. Se prepararon ensayos de unión de competición usando el análisis de transferencia puntual previamente descrito, para ensayar ARC126 con respecto a unión con PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB humanos (todos de PeptoTech, Rocky Hill, NJ). Los resultados del ensayo de unión de competición muestran que ARC126 (SEC ID N°: 4) se une con 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 con PDGF-AA (Figura 10A). A continuación, se realizó un estudio para determinar si ARC126 reaccionaba de forma cruzada con PDGF-BB de especies distintas del ser humano. Se prepararon ensayos de unión de competición por análisis de transferencia puntual, como se ha descrito previamente, usando PDGF-BB humano, de rata y de ratón (PeptoTech, Rocky Hill, NJ). Los resultados del ensayo de unión de competición muestran que ARC126 se une con PDGF-BB humano, de rata y de ratón con la misma afinidad (Figura 10B).

EJEMPLO 5

Ensayo de proliferación de células 3T3

Ya que se ha mostrado que ARC126 reacciona de forma cruzada con PDGF-BB humano, de rata y de ratón, podrían usarse células 3T3, que derivan de una línea celular de fibroblastos de rata (ATCC, Manassas, VA) en un ensayo de proliferación para ensayar la potencia de todos los aptámeros de PDGF, incluyendo aptámeros que se obtuvieron como parte de los intentos de desfluoración. 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 de la siguiente manera: se sembraron células 3T3 a 3.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos un día antes del inicio del ensayo en 100 μl de DMEM/FCS 10 %. Al día siguiente, las células se lavaron una vez con DMEM puro y después se añadieron 75 μl de DMEM/FCS 0,8 % a cada pocillo. Después se añadieron 25 μl de PDGF-BB (PeptoTech, Rocky Hill, NJ) a una concentración final de 50 ng/ml a cada pocillo +/- condición de aptámero para ensayar. Cada placa incluyó las siguientes condiciones por triplicado: sin PDGF lo que corresponde a crecimiento sin mitógeno (control negativo), un control de aptámero mezclado (ARC128) en el que no se observó ningún efecto en la velocidad de crecimiento (control negativo), un control positivo en el que se observa crecimiento máximo en ausencia de aptámero de PDGF, y una serie de diluciones de aptámero de PDGF funcionales a partir de las que podría calcularse una buena curva de CI_{50} . Las diluciones de aptámero de PDGF funcionales consisten habitualmente en 6 puntos de diluciones en serie dobles.

Las células se incubaron durante 3 días. Después de la incubación se añadieron 10 μl de MTT (Promega, Madison, WI) a cada pocillo y se incubaron durante 1,5 horas adicionales. Se retiró el medio, se añadieron 200 μl de Isopropanol (2-propanol) a cada pocillo, las células se resuspendieron exhaustivamente y se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas de 96 pocillos. El presente ejemplo representa la comparación de potencia del aptámero de PDGF ARC 127 con la de un anticuerpo policlonal neutralizador de PDGF como se muestra en la Figura 11A (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los datos mostrados en la Figura 11A demuestran que el aptámero presenta mejor potencia que el anticuerpo policlonal.

Se realizó el ensayo de proliferación de células 3T3 con ARC126, ARC127, ARC128 y con todos los otros derivados de aptámeros de PDGF que se obtuvieron como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior. ARC126 y ARC127 presentan de forma rutinaria valores de CI_{50} <20 nM mientras que ARC128 de control mezclado no presenta nunca un efecto de proliferación de células 3T3. La Tabla 5 a continuación muestra las CI_{50} de variantes de ARC126 en el ensayo de proliferación de 3T3.

ES 2 502 791 T3

Tabla 5. CI50 de variantes de ARC126 desfluoradas en ensayo de proliferación de 3T3.

Nº de ARC	CI50 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
-----	------

El aptámero de PDGF ARC 127 también bloquea la proliferación de células 3T3 mejor que los inhibidores de tirosina quinasa 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. ARC 127 redujo el aumento conducido por PDGF en la proliferación a niveles de fondo a una concentración tan baja como 30 nM. Ambos de los compuestos de AG presentaron potencias muchos peores en comparación con ARC127. AG-1433 parecía tener efectos tóxicos no específicos a niveles micromolares. Este efecto es visible comenzando a partir de 300 nM cuando los niveles de señal son menores que las muestras sin tratamiento solamente correspondientes a pérdida de señal debido a la letalidad de células solamente en presencia de compuesto AG (Figura 11B).

EJEMPLO 6

Ensayo de viabilidad de células 3T3

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 de PDGF activos podrían deberse potencialmente a efectos tóxicos del aptámero. Para ensayar esta posibilidad se realizó un ensayo de viabilidad celular Calceína AM (Molecular Probes, Eugene, OR). Se sembraron células 3T3 a 3.000 células/pocillo en placas, se trataron con diversas concentraciones de aptámero de PDGF hasta 40 μ M, y se ensayaron durante 24 y 48 horas. Se proporcionó TNF alfa (100 pg/ml) y se usó como un control positivo para inducir apoptosis. Después de la incubación las células se lavaron con PBS 1X. Se preparó Calceína AM de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el fabricante, se incubó durante 30 minutos y se determinó la intensidad de señal de fluorescencia en un lector de placas de 96 pocillos. No se observó aumento en la tasa de apoptosis de células 3T3 debido a ARC 127 (Figura 12).

EJEMPLO 7

Ensayo de migración de células 3T3 o RPE

El PDGF es un fuerte mitógeno así como un quimioatrayente. Se eligió un ensayo de migración realizado en formato tanto de 24 como de 96 pocillos como un ensayo funcional adicional para ensayar la potencia de ARC 127. En el ensayo de migración celular se sembraron 80.000 células fibroblastos de rata 3T3 (ATCC, Manassas, VA) o células RPE (epiteliales pigmentadas retinianas) (ATCC, Manassas, VA) por pocillo en una placa de 24 pocillos con filtros de 8 μ m (BD Biosciences, Discovery Labware, Bedford, MA). Se añadieron 0,5 ml de DMEM/FCS 0,2 % a la cámara superior y se añadieron 0,8 ml de DMEM/FCS 0,2 % a la cámara inferior. El sistema se equilibró incubando durante 24 horas a 37 grados. Se añadió PDGF-BB humano (PeproTech, Rocky Hill, NJ) (para células RPE) o PDGF-BB de rata (PeproTech) (para células 3T3) a la cámara inferior (concentración final 0 ng/ml -100 ng/ml). El sistema se incubó durante 4 horas a 12 horas. Las células se desprendieron por raspado en la parte superior del filtro con una punta Q. Las células que migraron del fondo del filtro se fijaron con una mezcla de Metanol 50 %/Acetona 50 % fría durante 3 minutos.

Después de la incubación los filtros se lavaron con PBS 1X y se tiñeron con Tinción Giemsa (Matheson Coleman and Bell) durante 1-2 horas y la migración se visualizó tomando imágenes en un microscopio Zeiss Axiovert 200 M. Específicamente, se visualizó la migración en cuatro condiciones diferentes: (1) migración de fondo 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 mezclado ARC128 100 nM. Los resultados de migración visualizados muestran que la presencia de ARC 127 100 nM inhibe los efectos de PDGF-BB 5 nM, lo que se muestra por la migración de células 3T3 o RPE a niveles de fondo. El control mezclado ARC128 no presenta ninguna actividad y la migración observada en esta condición es igual a la observada con PDGF BB 5 nM solamente.

La Figura 13 muestra los resultados de un experimento de migración celular realizado en un formato de 96 pocillos usando el Ensayo de Migración de 96 pocillos de Quimiotaxis QCM (N° ECM 510) (Chemicon, Temecula, CA). El formato de 96 pocillos permitió un análisis más cuantitativo de la migración celular que el formato de 24 pocillos, que era más cualitativo. El ensayo de 96 pocillos comienza poniendo las placas y reactivos a temperatura ambiente. Se añadieron 150 μ l de DMEM/FBS 0,2 % con o sin quimioatrayente a los pocillos de la bandeja de alimentación. Se añadieron 200.000 RPE en 100 μ l de medio DMEM/FBS 0,2 % a la cámara de migración y se incubaron durante 1-24 horas a 37 grados.

Después de la incubación, se retiró la placa de la cámara de migración y se descartaron las células no migratorias. El número de células migratorias se cuantificó de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el fabricante. Brevemente, se retiró el medio de la parte superior invirtiendo la suspensión celular restante, y se colocó en una nueva bandeja de alimentación que contiene 150 μ l de Solución de Desprendimiento Celular precalentada. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 grados. Se diluyó colorante CyQuant GR 1:75 con Tampón de Lisis 4X y

se añadieron 50 μ l de Tampón de Lisis/Solución Colorante a cada pocillo que contenía 150 μ l de la solución que contenía células migratorias. La mezcla se incubó adicionalmente durante 15 minutos a temperatura ambiente, después 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.

Los resultados obtenidos en este experimento de migración celular de formato de 96 pocillos (Figura 13) confirmaron los experimentos de migración celular realizados en el formato de 24 pocillos. ARC127 redujo los niveles de migración a los de fondo y el aptámero mezclado ARC128 no afectó a la migración. La Figura 13 también muestra que la migración observada aumenta linealmente en función del número de células o concentración de mitógeno añadido.

EJEMPLO 8

Ensayo de crecimiento clonogénico

Se cultivaron células de glioblastoma U87 (ATCC) en presencia o ausencia de mitógeno así como aptámero como se muestra en los paneles. Se sembraron células U87 en DMEM/FBS 10 % hasta una confluencia del 50 % en placas de 100 mm. Las células se incubaron con PDGF-BB (PeproTech) +/-ARC127 hasta que las células parecieran confluyentes (1-2 días). La adición de una concentración final de PDGF BB de 50 ng/ml solamente provocó la aparición de grupos celulares tridimensionales altamente conectados. La adición de PDGF-BB 50 ng/ml más aptámero funcional ARC127 de 10 nM a 100 nM redujo la aparición de grupos al nivel de fondo. La presencia del aptámero no tuvo ningún efecto en la tasa de proliferación de las células determinada por el ensayo de MTT. Por lo tanto, el aptámero bloquea la adhesión de célula a célula de las células U87 que se sabe que tienen bucles autocrinos conducidos por PDGF. ARC127 parece bloquear la unión del ligando presentado en superficie celular con el receptor de otra célula como se presenta por adhesión de célula a célula.

EJEMPLO 9

Ensayo de luciferasa ELK conducido por PDGF

Para demostrar adicionalmente la actividad del aptámero de PDGF ARC 127, se prepararon ensayos de genes indicadores de Luciferasa Elk mecánicos. Se sembraron 10.000 células 3T3/pocillo en DMEM/FBS 10 % en una placa de 96 pocillos. Se transfectaron usando Eugene (Roche, Indianápolis, IN) a una relación 3:1 con 5 ng de ELK-1 (Stratagene, La Jolla, CA) y 20 ng de plásmidos de Luciferasa-pFR (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 corresponde al efecto del mitógeno en el gen indicador. Se usó ensayo de Luciferasa Steady Glo (Promega, Madison, WI) para detectar luciferasa. Los resultados indican que una concentración de ARC127 tan baja como 3 nM reduce la señal de Luciferasa a niveles sin mitógeno. La CI50 de ARC127 deducida de este análisis es < 2 nM. Figura 14.

EJEMPLO 10

Datos *in vivo* en modelos de xenoinjerto de cáncer de colon HT-29 y LS174T

Se establecieron estudios de eficacia *in vivo* para ensayar la hipótesis de que la inhibición de PDGF-BB y/o su receptor con ARC127 y ARC308 aumenta la eficacia de fármacos citotóxicos.

Visión de conjunto experimental. Se establecieron xenotrasplantes de cáncer de colon HT-29 o LS 174T en ratones desnudos atímicos (ratones Nu/Nu, Charles River Labs, Wililmington, MA) inyectando a los ratones 1×10^7 células HT29 (ATCC, Manassas, VA) o 2×10^6 células LS 174T (ATCC Manassas, VA) por vía subcutánea y permitiendo que los tumores crecieran durante 5 días. El día 5, se tomaron mediciones bidimensionales de los tumores establecidos usando un calibrador digital. Una vez que se tomaron las medidas tumorales, los ratones se seleccionaron aleatoriamente en grupos de modo que el tamaño tumoral medio fuera el mismo en cada grupo. Una vez seleccionados de forma aleatoria, los ratones se trataron con irinotecán (Pfizer, NY, NY) que es un fármaco citotóxico que se ha mostrado que tiene eficacia contra cáncer de colon en presencia o ausencia de bloqueo de PDGF usando un aptámero específico de PDGF u otra molécula pequeña inhibidora, para determinar si el bloqueo de PDGF aumenta la eficacia del fármaco citotóxico.

Materiales y métodos. Se diseñó un experimento (Experimento 1) para ensayar una combinación de agentes quimioterapéuticos conocidos GLEEVEC[™] e irinotecán en un estudio de optimización de dosis en un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon HT29. La Tabla 6 a continuación resume el diseño experimental del Experimento 1 usando una línea celular de carcinoma de colon humano HT29 (ATCC, Manassas, VA), con un fármaco citotóxico, irinotecán (Pfizer, NY, NY) administrado a 150 mg/kg mediante inyección intraperitoneal una vez a la semana, así como un fármaco para bloquear la señalización de PDGF, GLEEVEC[™] (Novartis, Basilea, Suiza) dosificado por vía oral a 50 mg/kg dos veces al día (de Lunes a Viernes). Aunque se sabe que el modo de acción de GLEEVEC[™] bloquea la función del receptor de PDGF así como otros receptores para otros factores de crecimiento, el efecto no

5 es necesariamente específico de PDGF. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 15A que muestra una representación del diámetro tumoral medio en promedio de grupo en mm en función del tiempo para cada uno de los regímenes de tratamiento irinotecán 150 mg/kg semanalmente, GLEEVEC™ 50 mg/kg por vía oral BID Qd5, y terapias de combinación de irinotecán 150 mg/GLEEVEC™ 50 mg/kg BID Qd5. Estos datos muestran que GLEEVEC™ aumenta la eficacia del irinotecán solo en modelos de xenotrasplante de cáncer de colon HT29. El bloqueo de PDGF mediado por GLEEVEC™ potenció la eficacia del tratamiento con irinotecán como se demuestra por la tasa de crecimiento tumoral reducida en comparación con animales tratados solamente con irinotecán. Los resultados son estadísticamente significativos (ensayo de T de student de dos colas).

Tabla 6: experimento 1 estudio de optimización de dosis de irinotecán/GLEEVEC para HT29

Número de Estudio Animal: 03003-005 Fecha de Inicio Propuesta: 13-01-03		Administración de Terapia de Combinación (POR FAVOR DOSIFICAR DESPUES DEL ARTICULO DE ENSAYO)										Días del Sacrificio							
Inoculación Tumoral										Administración del Artículo de Ensayo					Administración de Terapia de Combinación (POR FAVOR DOSIFICAR DESPUES DEL ARTICULO DE ENSAYO)				
Grupo	Nº de Animales	Material de Ensayo	Dosis	Vía	Día	Material de Ensayo	Dosis (mg/kg)	Vía	Día	Material de Ensayo	Dosis (mg/kg)	Vía	Día	Material de Ensayo	Dosis (mg/kg)	Vía	Día		
1	10	HT-29	1 x 10 ⁷ células	SC	Día 0	Diluyente	DVE	IP	Días 7, 14, 21	ND	ND	IP	SID Días 4-21	ND	ND	IP	Por designar		
2	10					Diluyente	DVE			ARC127	50			ARC127	50				
3	10					Irinotecán	150			ND	ND			ND	ND				
4	10					Irinotecán	50			ND	ND			ND	ND				
5	10					Irinotecán	150			ARC127	50			ARC127	50				
6	10					Irinotecán	50			ARC127	50			ARC127	50				
7	10					Irinotecán	150			Gleevec	100			Gleevec	100				
8	10					Irinotecán	50			Gleevec	100			Gleevec	100				
9						Diluyente	DVE			Gleevec	100			Gleevec	100				

1. Observaciones en la jaula y clínicas diarias. DVE = equivalente de volumen de dosis del tampón
 2. Pesos corporales – bisemanalmente, HT29 = carcinoma de colon humano, ATCC N° HTB-38
 3. Mediciones tumorales - bisemanalmente comenzando aproximadamente el día 7, IP = intraperitoneal
 4. Irinotecán total necesario - 450 mg (para 3 dosis), PO = por vía oral
 5. Gleevec total necesario - 1350 mg (para 36 dosis)
 6. Aptámero de PDGF total necesario - 675 mg (para 18 dosis)

Se diseñó otro experimento (Experimento 2) para ensayar ARC127 e irinotecán en un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon usando la línea celular de carcinoma de colon humano LS 174T (ATCC, Manassas, VA). Se dosificó fármaco citotóxico, irinotecán (Pfizer, NY, NY) una vez a la semana a 150 mg/kg por suministro intraperitoneal. Se dosificó ARC127 usado para bloquear la señalización de PDGF a 50 mg/kg por suministro intraperitoneal una vez al día, y se dosificó GLEEVEC™ (Novartis, Basilea, Suiza) por vía oral a 100 mg/kg una vez al día, de lunes a viernes. ARC127 evita que PDGF-BB se una con el receptor de PDGF, y tiene un PEG de 40 K unido. La Tabla 7 a continuación resume el diseño experimental para el Experimento 2. Los resultados del Experimento 2 se muestran en la Figura 15B que demuestra que ARC127 potenció la eficacia del tratamiento con irinotecán como se demuestra por la tasa de crecimiento tumoral reducida en comparación con animales tratados solamente con irinotecán. Los resultados son estadísticamente significativos (ensayo de T de student de dos colas). Los datos muestran claramente que ARC127 aumenta la eficacia del irinotecán mejor que tanto el tratamiento de combinación de GLEEVEC™/Irinotecán como el de irinotecán por sí solo en modelo de xenotrasplante de cáncer de colon LS174T. El régimen de dosificación de GLEEVEC™ (100 mg/kg una vez al día, de Lunes a Viernes, P.O.) hizo a los animales moribundos y estos grupos se terminaron pronto en el experimento (Figura 15B).

Tabla 7: estudio de dosificación de ARC127/irinotecán en el diseño experimental del modelo de xenoinjerto de cáncer de colon:

Número de Estudio Animal: 03003-007															
Fecha de Inicio Propuesta: 5-02-03															
Inoculación de Tumor					Administración de Artículo de Ensayo					Administración de Terapia de Combinación (POR FAVOR DOSIFICAR DESPUÉS DEL ARTÍCULO DE ENSAYO)					Día del Sacrificio
Grupo	Nº de Animales	Material de Ensayo	Dosis	Vía	Día	Material de Ensayo	Dosis (mg/kg)	Vía	Día	Material de Ensayo	Dosis (mg/kg)	Vía	Día	Día del Sacrificio	
1	10	LS/174T	2 x 10 ⁸ células	SC	Día 0	Diluyente	DVE	IP	Días 8, 15, 22	ND	ND	IP	SID Días 4-21	Por designar	
2	10					Diluyente	DVE			ARC 127	50				
3	10					Irinotecán	150			ND	ND				
4	10					Irinotecán	150			ARC127	50				
5	10					Irinotecán	150			Gleevec	100				
6	10					Diluyente	DVE			Gleevec	100	PO			

1. Observaciones en jaula y clínicas – diariamente, DVE = equivalente de volumen de dosis de tampón
2. Pesos corporales – bisemanalmente, LS174T = carcinoma de colon humano
3. Medidas tumorales - bisemanalmente comenzando aproximadamente el día 4, IP = intraperitoneal
4. Irinotecán total necesario - 337,5 mg (para 3 dosis)
5. Gleevec total necesario - 360 mg (para 16 dosis)
6. Aptámero de PDGF total necesario - 450 mg (para 18 dosis)

Se diseñó un tercer experimento (Experimento 3) para ensayar regímenes de dosificación de ARC308/irinotecán y GLEEVEC™/irinotecán en un modelo de xenotrasplante de cáncer de colon usando la línea celular de carcinoma de colon humano LS174T (ATCC). Se dosificó el fármaco citotóxico irinotecán (Pfizer, NY, NY) mediante suministro intraperitoneal a 150 mg/kg una vez a la semana. Se dosificó ARC308 mediante suministro intraperitoneal a 50 mg/kg una vez al día, y se dosificó GLEEVEC™ a 50 mg/kg una vez al día, de lunes a viernes. ARC308 evita que PDGF-BB se una con el receptor de PDGF; esta molécula tiene un PEG de 30 K unida. Los resultados del Experimento 3 se muestran en la Figura 16 que muestra que ARC 308 potenció la eficacia del tratamiento con irinotecán como se demuestra por la tasa de crecimiento tumoral reducida en comparación con los animales tratados solamente con irinotecán (Figura 16). Por el contrario el régimen de dosificación de GLEEVEC™ (50 mg/kg una vez al día, de Lunes a Viernes, P.O.) no potenció la eficacia del irinotecán. Los resultados son estadísticamente significativos (ensayo de T de student de dos colas). La Tabla 8 resume el diseño experimental para el Experimento 3.

Tabla 8. Estudio de ARC308/irinotecán y GLEEVEC/irinotecán en modelo de xenoinjerto de cáncer de colon LS174T.
 Número de Estudio Animal: 03003-014
 Fecha de Inicio Propuesta: 4-03-04

Inoculación de Tumor		Administración de Artículo de Ensayo				Administración de Terapia de Combinación (POR FAVOR DOSIFICAR DESPUÉS DEL ARTÍCULO DE ENSAYO)				Día del Sacrificio
Grupo	Nº de Animales	Material de Ensayo	Dosis	Vía	Día	Material de Ensayo	Dosis (mg/kg)	Vía	Día	
1	10	LS174T	2 x 10 ⁶ células	SC	Día 0	Diluyente	DVE	IP	Días 8, 15, 22	Por designar
2	10					Diluyente	DVE			
3	10					Irinotecán	150			
4	10					Irinotecán	150			
5	10					Irinotecán	150			
6	10					Diluyente	DVE			
1. Observaciones en jaula y clínicas - diariamente 2. Pesos corporales - semanalmente 3. Medidas tumorales - bisemanalmente comenzando aproximadamente el día 4 4. Irinotecán 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 de Volumen de Dosis de tampón LS174T = carcinoma de colon humano IP = Intraperitoneal										

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

5 EJEMPLO 11

Aptámeros bifuncionales de PDGF/VEGF como productos terapéuticos oncológicos

10 Las terapias de combinación tienen ventajas sobre las terapias de un único 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 invención (Ejemplo 10). De forma similar, los aptámeros que son capaces de unirse con más de una de las dianas que están implicadas en cánceres de tumores sólidos también son eficaces en la potenciación de los efectos terapéuticos de agentes terapéuticos individuales. Aptámeros tales como estos pueden inhibir múltiples proteínas (u otras dianas) y por lo tanto proporcionan un único compuesto que actúa de una manera que es sustancialmente
15 equivalente a una combinación de compuestos. Pueden realizarse por ingeniería genética aptámeros multifuncionales, por ejemplo, a partir de combinaciones de aptámeros conocidos. Puede mostrarse que estos aptámeros multifuncionales se unen con múltiples dianas, y pueden generarse directamente por síntesis químicas de fase sólida o por transcripción a partir de un molde de ADN correspondiente. Los ejemplos de dichos aptámeros multifuncionales incluyen aptámeros capaces de unirse con VEGF y PDGF para indicaciones de cáncer.

20 Para diseñar aptámeros multifuncionales a partir de aptámeros previamente identificados (o regiones de aptámeros) es importante unir los aptámeros individuales mediante regiones del aptámero individual que no entran en contacto con la diana. Esto puede conseguirse normalmente identificando regiones de la estructura secundaria que toleran la sustitución de nucleótidos individuales en la mayoría de o todas las posiciones. Si se requieren unidades
25 estructurales, tal como un tallo, entonces estas pueden conservarse en el diseño final. Adicionalmente, es importante que se conserve la integridad estructural de cada uno de los aptámeros individuales en la estructura plegada final. Esto puede conseguirse más fácilmente prediciendo las estructuras secundarias de las secuencias de aptámero originales usando un algoritmo tal como mfold, y asegurando después que estas estructuras secundarias predichas se conservan, de acuerdo con el mismo algoritmo, cuando son parte de la estructura unida. El algoritmo
30 general mfold para determinar múltiples estructuras secundarias óptimas y subóptimas se describe por el autor del programa, Dr. Michael Zuker (Science 244, 48-52 (1989)). Se presenta una descripción de los parámetros de plegamiento usados en el algoritmo en Jaeger, Turner, y Zuker, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989) 86, 7706-7710 (véase también M. Zuker, *et al.*, 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 de acuerdo con los métodos de la
35 presente invención para obtener estructuras secundarias de secuencias de ácido nucleico 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 Res., Nov. 15; 25(22): 4679-84 (1997).

40 Habiendo determinado los motivos estructurales secundarios y unidades de los aptámeros componentes, estos se combinan en un único oligonucleótido que se pliega de una manera que conserva las funcionalidades de cada uno de los aptámeros constituyentes. Como resultado, los aptámeros multifuncionales son capaces de unirse con
45 múltiples dianas y pueden generarse bien directamente por síntesis química de fase sólida o bien mediante transcripción a partir de un molde de ADN correspondiente.

Aptámeros bifuncionales de VEGF y PDGF. Los métodos de la presente invención se aplicaron para generar un aptámero que tuviera especificidad de unión por PDGF BB y VEGF. Este aptámero multifuncional se generó uniendo
50 dos aptámeros individualmente identificados usando SELEX - uno (ARC 245, SEC ID N°: 7) que reconoce VEGF pero no PDGF (véase Figura 17A) y uno (ARC 126, 5'-(SEC ID N°: 1)-HEG-(SEC ID N°: 2)-HEG-(SEC ID N°: 3)-3' dT-3') que reconocía PDGF pero no VEGF (véase Figura 17B). ARC245 (SEC ID N°: 7) es un aptámero completamente 2'O metilado (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.

55 En la Figura 18A se muestra un esquema de la estructura y secuencia del aptámero multivalente capaz de unirse con PDGF y VEGF resultante de esta combinación, secuencia TK.131.012.A (SEC ID N°: 9). También se formó un segundo aptámero multivalente capaz de unirse con VEGF y PDGF, secuencia TK.131.012.B (SEC ID N°: 10) combinando ARC245 (SEC ID N°: 7) y ARC 126. Como se muestra en la Figura 18B, en este aptámero multivalente de VEGF-PDGF se retiró el primer par mA-mU del tallo de ARC245 antes de unir ARC245 y ARC126 todo desoxi. En cada caso, como se muestra en la Figura 18, se retiró uno de los enlazadores de PEG de ARC126 para la adición del aptámero específico de VEGF y el otro se sustituyó con un enlazador oligonucleotídico que tenía la secuencia dGdAdAdA.

65 Los datos de unión para los aptámeros constituyentes y los aptámeros multivalentes se recogieron por ensayos de transferencia puntual en los que el aptámero radiomarcado se incubaba con la diana proteica y después se pasa a

través de un sándwich de nitrocelulosa sobre nylon y los resultados se muestran en la Figura 19. El radiomarcador asociado con proteína se captura en la membrana de nitrocelulosa mientras que el resto del radiomarcador se captura en la membrana de nylon. Los datos de radiomarcador se recogen en una placa de fósforo fotoestimulable. Estos datos se usan después 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 de forma sintética.

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.

EJEMPLO 12

Aptámeros de PDGF y VEGF que contienen motivos inmunoestimuladores

Para ensayar la capacidad de los aptámeros que comprenden un motivo o motivos CpG para estimular la respuesta inmunitaria innata, se introdujo por ingeniería genética un motivo CpG murino en un aptámero específico para PDGF-B. Estos aptámeros se usaron después 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-alfa). Estos aptámeros también se usaron en ensayos de actividad biológica basados en el mecanismo del aptámero (señalización de PDGF-B a través de la ruta de MAPK como se mide por el efecto del aptámero de CpG-PDGF-B en la activación de PDGF-B de Fosforilación de ERK) para confirmar la funcionalidad del aptámero que comprende motivos CpG tras la unión del aptámero con su diana, este caso PDGF-B.

Para generar los aptámeros desvelados en el presente documento con un motivo CpG incluido o unido, la secuencia de oligonucleótidos inmunoestimuladores previamente identificados que comprenden motivos CpG ("ISS-ODN" o "ODN") o fragmentos de la misma se introdujeron por ingeniería genética en ARC124, un aptámero identificado mediante el proceso de SELEX que se une con PDGF AB y BB con una K_d de aproximadamente 100 pm. La secuencia de ARC 124 se muestra a continuación.

ARC124

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

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

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)

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*

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*G*A* G

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)

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

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

Las secuencias de los aptámeros de PDGF que comprenden un motivo CpG se muestran a continuación 5'→ 3' de izquierda a derecha (en la que un * indica un enlace fosforotioato y 3InvdT indica una T invertida en el extremo 3'). Se muestra un esquema de la secuencia y estructura secundaria de estos aptámeros en la Figura 20.

5 **CpGARC124corto también conocido como ARC124corto (SEC ID N°: 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/**

CpGARC124 largo también conocido como ARC124largo (SEC ID N°: 21)

10 **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/**

CpGARC124completo también denominado en el presente documento ARC124completo (SEC ID N°: 22)

15 **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/

20 **TransARC124.2 (SEC ID N°: 24)**

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

TransARC124.3 (SEC ID N°: 25)

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

TransARC124.4 (SEC ID N°: 26)

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

TransARC124.5 (SEC ID N°: 27)

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

TransARC124.6 (SEC ID N°: 28)

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

TransARC124.7 (SEC ID N°: 29)

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

TransARC124.8 (SEC ID N°: 30)

40 C*A*G*GCGTCGTTTCGACGAGCATCACCATGATC*C*T*G*/3InvdT/

TransARC124.9 (SEC ID N°: 31)

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

TransARC124.10 (SEC ID N°: 32)

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

TransARC124.11 (SEC ID N°: 33)

C*A*G*GCTACGTCGTCGTAGAGCATCAcCATGATC*C*T*G*/3InvdT/

50 Como se ha indicado anteriormente, ISS-ODN y ODN 2006 son oligonucleótidos fosforotioatos que se ha indicado que son inmunoestimuladores y sus secuencias derivan de la bibliografía. Se han diseñado versiones truncadas de estos oligonucleótidos acortándolos a partir de sus extremos tanto 5' como 3'. Las construcciones resultantes son ISS-ODN2 a 5 y ODN 2006.2 a 3. Cada una de las construcciones de nuevo diseño se ensayó en el ensayo de liberación de IL-6 para evaluar el efecto en la capacidad inmunoestimuladora. La construcción más corta que aún conservaba la capacidad para inducir la liberación de IL-6 se seleccionó para la secuencia añadida al extremo 5' o 3' de ARC124. Las construcciones que están marcadas como CpGARC124corto también conocido como ARC124corto, CpGARC124largo también conocido como ARC124largo y CpGARC124completo también conocido como ARC124completo corresponden a construcciones en las que ISS-ODN4 está unido al extremo 5' de ARC124. Estas construcciones portan enlaces fosforotioatados 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 media central correspondiente a ARC124 está libre de enlaces fosforotioato.

ARC124 en la posición 8-9 y 13-14 tiene dos islas CpG de origen natural. Las construcciones con la nomenclatura de TransARC124.1 a TransARC124.11 corresponden a construcciones que hacen uso de estas dos secuencias de CpG de origen natural para crear una secuencia inmunoestimuladora que maximizaría la respuesta de CpG basándose en informes de la bibliografía de que los motivos CpG que están incluidos en diversas longitudes de T crean un efecto inmunoestimulador máximo. Por lo tanto, los cambios que se realizaron en ARC124 consistieron en sustituir la protuberancia GCA no esencial en la posición 10-12 con diversos restos T. El efecto de variar la protuberancia de T en el efecto inmunoestimulador así como la adición de enlaces fosforilados en la estabilidad de la construcción se evalúa con el ensayo de liberación de IL-6 y la fosforilación de ERK como se describe en el presente documento.

Para controles negativos, ARC124 se modificó por ingeniería genética para retirar los motivos CpG. Estas secuencias de control se muestran a continuación.

TransARC124.3control (Aptámero mezclado de CpG) (SEC ID N°: 34)

C*A*G*GCAAG*C*T*T*T*G*CTTGAGCATCACCATGATC*C*T*G*/3InvdT/

TransARC124.5control (Aptámero mezclado de CpG) (SEC ID N°: 35)

C*A*G*GCAAG*C*T*T*T*G*CTTGAGCATCACCATGATC*C*T*G*/3InvdT

La actividad de aptámeros de PDGF que contienen islas CpG de la presente invención se ensayó en ensayos basados en células. Los 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 presencia de islas CpG. Por lo tanto, se usó un ELISA de fase sólida de IL-6 y TNF-alfa para cuantificar los niveles de IL-6 y TNF-alfa liberados a los sobrenadantes (ambos de R&D System, Minneapolis, MN) tras la exposición a diversos oligonucleótidos que comprenden secuencias de CpG. Para el ELISA de IL-6, se recubrió previamente una microplaca de 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal específico para IL-6 de ratón. Se usó un anticuerpo policlonal ligado a enzima específico para IL-6 de ratón para detectar cualquier IL-6 unida de los sobrenadantes celulares. Para el ELISA de TNF-alfa, se recubrió previamente una microplaca de 96 pocillos con un anticuerpo policlonal purificado por afinidad específico para TNF-alfa de ratón. Se usó un anticuerpo policlonal ligado a enzima específico para TNF-alfa de ratón para detectar cualquier TNF-alfa unido de los sobrenadantes celulares. Ambos ELISA usaron una lectura colorimétrica cuantificada por espectrofotometría.

Se cultivaron células J774A.1 (células TIB) en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37 °C, CO₂ 5 %. Se sembraron 100.000 células en un número apropiado de pocillos en una placa de 24 pocillos un día antes del experimento. Los aptámeros de PDGF con inclusión de CpG se incubaron con las células durante 24 y 48 horas a 37 °C, CO₂ 5 %. Las concentraciones de aptámeros finales fueron de 1 µM y 10 µM. Se recogieron sobrenadantes en los puntos temporales indicados y se centrifugaron durante 8 minutos a 5.000 rpm a 4 °C. Los sobrenadantes centrifugados se congelaron a -20 °C hasta su uso en el ELISA de IL-6 o TNF-alfa. Ambos ELISA se usaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usaron oligonucleótidos que contenían motivos CpG que se había indicado previamente que eran inmunoestimuladores (ISS ODN y ODN2006) y LPS (Sigma), como controles positivos y se usaron aptámeros que no contenían CpG como controles negativos. La Figura 21A muestra los resultados de un ELISA IL-6 que mide la liberación de IL-6 en células TIB usando solamente los ODN convencionales como controles positivos, y aptámeros que no contienen islas CpG como controles negativos en el ensayo. Los controles positivos y negativos solamente se usaron en este experimento para establecer si este ensayo era suficientemente robusto para medir la liberación de IL-6 inducida por CpG. Los datos mostrados en la Figura 21B demuestran que el ISS ODN y versiones acortadas del ISS ODN inducen la liberación de IL-6 en células TIB mejor que ODN2006 y versiones acortadas del mismo. La Figura 21C muestra que las versiones corta, larga y completa de ARC 124 con motivos CpG incluidos inducen la liberación de IL-6 en células TIB así como el ISS ODN. Los datos mostrados en la Figura 21D muestran que TransARC124.1-TransARC124.7 (SEC ID N°: 23 - SEC ID N°: 29) inducen la liberación de IL-6 en células TIB. Los datos mostrados en la Figura 21E muestran que TransARC124.1-TransARC124.7 induce la liberación de TNF-alfa en células TIB.

Los resultados de los ensayos de liberación de IL-6 y liberación de TNF-alfa muestran que cuando se incorporan motivos CpG en aptámeros existentes, en este caso ARC 124 (SEC ID N°: 11), el aptámero es capaz de Inducir una respuesta CpG.

EJEMPLO 13

Aptámeros de PDGF que contienen islas CpG en el ensayo de fosforilación de ERK

Se usó fosforilación de ERK para ensayar si ARC124 (SEC ID N°: 11) conservaba su funcionalidad después de la incorporación de motivos CpG en la secuencia de aptámeros. Se sembraron ciento cincuenta mil células 3T3 (una línea celular de fibroblastos de ratón que contiene PDGF-R) en una placa apropiada de pocillos en una placa de 12 pocillos un día antes del experimento y se privó de suero en FBS 0,5 % durante una noche. Las células se trataron con PDGF-BB 10 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) en presencia o ausencia de aptámeros de PDGF

que contienen islas CpG durante 30 minutos. Las células se recogieron y lisaron con tampón de lisis que contenía Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, NP-40 0,125 %, Brij 97 0,875 %, vanadato sódico 1,5 mM y comprimido inhibidor de proteasa sin EDTA 1 mM. La concentración de proteínas en lisados celulares se determinó usando el reactivo de ensayo de proteína BIO-RAD de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad, Hercules, CA). Se prepararon lisados añadiendo Tampón de Muestras NuPage LDS 4X con DTT 0,1 M a una concentración final de 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se incubó a 70 °C durante 7 minutos. Se cargaron cuarenta microgramos de proteína total en cada pocillo de un gel NuPage 10 % Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA). El gel se procesó a 100 mA durante 1 hora. El gel se transfirió después a una membrana de nitrocelulosa de ECL HyBond (Amersham, Piscataway, NJ) a 250 mA durante 3 horas. Después de la transferencia, la nitrocelulosa se bloqueó con BSA 5 % (Sigma, St. Louis, MO) en PBS durante una hora a temperatura ambiente. La membrana de nitrocelulosa se incubó con un anticuerpo de MAP Quinasa p44/42 durante una noche a 4 °C (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). La membrana de nitrocelulosa se lavó 3X con PBS que contenía Tween 20 1 % y después se incubó con un anticuerpo conjugado con HRP anti IgG de conejo durante 1 hora (Amersham, Piscataway, NJ). Después de la incubación de una hora, la membrana de nitrocelulosa se lavó 3X con PBS que contenía Tween 20. La membrana se reveló usando un Sistema de Detección de Transferencia de Western + ECL de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Amersham, Piscataway, NJ) y se exploró usando un STORM 860 (Amersham). Se usaron células 3T3 en presencia de PDGF-BB sin aptámero como un control positivo.

Los resultados muestran que ARC124corto y ARC124largo, ambos aptámeros de PDGF que portan motivos CpG conocidos, aún son funcionalmente activos y pueden bloquear la fosforilación de ERK tras la unión con PDGF.

Colectivamente, los datos muestran que cuando se incorporan motivos CpG en aptámeros existentes, el aptámero es capaz de inducir una respuesta de CpG y aún mantener la capacidad de bloquear los efectos conducidos por diana no CpG (por ejemplo, PDGF) (por ejemplo, fosforilación de ERK-MAPK) con la misma potencia que los aptámeros nativos.

EJEMPLO 14

Selección de PDGF-AA

Sumario de selección de PDGF-AA

Se completó una selección para la forma corta de PDGF-AA (Roche Biomedical) usando un grupo que contenía 2-fluoro pirimidina. El ciclo 1 de la selección comenzó con la incubación de 2×10^{14} moléculas del grupo de ARC 212 2'F pirimidina modificado (5' GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGA-N40-GCUCGCGCCAGAGACCAACCGAGAA 3') (SEC ID N°: 74), incluyendo una adición de grupo marcado con cuerpo de ATP $\alpha^{32}\text{P}$, con 50 pmoles de proteína PDGF-AA en un volumen final de 100 μl durante 1 hora a temperatura ambiente. La selección se realizó en tampón SHMCK 1X, pH 7,4, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1mM). Se separaron los complejos de ARN:PDGF-AA y moléculas de ARN libres usando columnas de centrifugación de nitrocelulosa de 0,45 μm de Schleicher y Schuell (Keene, NH). La columna se prelavó con 1 ml de SHMCK 1X, y después se añadió la solución que contenía proteína:ARN a la columna y se centrifugó en una centrífuga a 1500 g durante 2 minutos. Se realizaron lavados de tampón para retirar los compuestos de unión no específica de los filtros (Ciclo 1, 2 x 500 μl de SHMCK 1X; en ciclos posteriores, se usaron lavados más rigurosos (número aumentado de lavados y volumen) para enriquecer con respecto a productos de unión específica, después los complejos de proteína:ARN unidos a los filtros se eluyeron con dos lavados de 200 μl (2 lavados de 100 μl en ciclos 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, después se precipitó (40 μg de glucógeno, 1 volumen de isopropanol). El ARN se transcribió de forma inversa con el sistema de RT-PCR™ ThermoScript de acuerdo con sus instrucciones, usando los cebadores 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 pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl_2 2 mM, KMT.108.38.C 0,5 μM , KMT.108.38.D 0,5 mM, 0,5 mM de cada dNTP, Taq polimerasa 0,05 unidades/ μl (New England Biolabs)). El molde de PCR se purificó usando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen). Los moldes se transcribieron usando marcaje de cuerpo de ATP $\alpha^{32}\text{P}$ durante una noche a 37 °C (PEG-8000 4 %, Tris 40 mM pH 8,0, MgCl_2 12 mM, espermidina 1 mM, Tritón x-100 0,002 %, purinas 2'OH 3 mM, pirimidinas 2'F 3 mM, DTT 25 mM, pirofosfatasa inorgánica, ARN polimerasa T7 mutante individual Y639F, $\alpha^{32}\text{P}$ ATP 5 μCi). Las reacciones se desalaron usando columnas Bio Spin (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se repitieron ciclos posteriores usando el mismo método que para el ciclo 1, pero con la adición de una etapa de selección negativa. Antes de la incubación con la diana proteica, el ARN agrupado se pasó a través de nitrocelulosa de 0,45 micrómetros para retirar las secuencias que se unían al filtro, después el filtrado se llevó a la etapa de selección positiva. En ciclos alternantes, el ARN agrupado se purificó en gel. Las reacciones de transcripción se detuvieron con EDTA 50 mM y se precipitaron con etanol, después se purificaron en geles de poliacrilamida desnaturizantes de 1,5 mm, (urea 8 M, acrilamida 10 %; acrilamida:bisacrilamida 19:1). Se retiró al ARN agrupado del gel por electroelución en un aparato Elutrap® (Schleicher y Schuell, Keene, NH) a 225 V durante 1 hora en TBE

1X (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 0,2 mM). El material eluido se precipitó por la adición de acetato sódico 300 mM y 2,5 volúmenes de etanol.

5 El ARN permaneció en exceso de la proteína durante la sección (ARN ~ 1 μ M). La concentración proteica fue de 500 nM para los primeros 4 ciclos, y después se redujo gradualmente durante los ciclos sucesivos. Se añadió ARNt competidor a las reacciones de unión a 0,1 mg/ml comenzando en el ciclo 2. Se completó un total de 11 ciclos, realizando ensayos de unión en ciclos seleccionados. La Tabla 9 contiene los detalles de selección incluyendo la concentración de ARN agrupado, la concentración de proteínas y la concentración de ARNt usada para cada ciclo. Se usaron los valores de elución (relación de valores de CPM de ARN unido a proteína frente a ARN total que fluye a través de la columna de filtro) junto con ensayos de unión para controlar el progreso de la selección.

Tabla 9. Condiciones usadas para la selección PDGF-AA (forma humana corta)

sfh-PDGFAA							
Nº de ciclo	Concentración de grupo de ARN (μ M)	tipo de proteína	concentración de proteína (μ M)	concentración de ARNt (mg/ml)	neg	% de elución	Nº de ciclo de PCR
1	3,3	sfhPDGFAA	0,5	0	ninguno	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	sfhPDGPAA	0,2	0,1	NC	4,32	7

Análisis de unión de proteínas

15 Se realizaron ensayos de unión de transferencia puntual durante la selección para controlar la afinidad de unión de proteínas del grupo. Se combinó ARN marcado con 32 P traza con PDGF-AA y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en SHMCK 1X más ARNt 0,1 mg/ml para un volumen final de 20 μ l. La reacción se añadió a un aparato de transferencia puntual (Transferencia Puntual de Colector 1 de Schleicher y Schuell, Acrylic), ensamblado (de arriba abajo) con membranas de nitrocelulosa, nylon y transferencia de gel. Se captura ARN que está unido a la proteína en el filtro de nitrocelulosa, mientras que el ARN no unido a proteína se captura en el filtro de nylon. Cuando se vio una relación positiva significativa de la unión de ARN en presencia de PDGF-AA frente a en ausencia de PDGF-AA, el grupo se clonó usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se clonó el molde del grupo del Ciclo 10, y se obtuvieron 17 secuencias. Solo se vieron cinco secuencias diferentes, con dos familias principales y una secuencia única (no de las dos familias). Para la determinación de K_d , los transcritos de ARN clonados se marcaron en el extremo 5' con γ - 32 P ATP. Se determinaron los valores de K_d usando el ensayo de transferencia puntual y ajustando una ecuación que describía un complejo de ARN:proteína 1:1 a los datos resultantes (Kaleidagraph, Figuras 23A y 23B). Los resultados de la caracterización de unión de proteínas se presentan en la Tabla 10. Se prepararon clones con alta afinidad por PDGF-AA y se exploraron con respecto a funcionalidad en ensayos basados en células.

Tabla 10. Actividad de unión de clones*

R10

Clones de PDGF-AA

Nº	Nombre del clon	PDGF-AA (forma humana corta) K_d (nM)	PDGF-AA (rata) K_d (nM)
1	ARX33P1.D1	N.B.	N.B.
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.B. = no se observó unión significativa

*Todas las mediciones se realizaron en presencia de ARNt 0,1 mg/ml junto con el ARC 212 de grupo no sensibilizado (que no mostró unión significativa). Cuando no se incluyó ARNt en las reacciones, los valores de K_d medidos fueron aproximadamente 2-3 veces menores (es decir mayor afinidad).

Aptámeros de PDGF-AA

Las secuencias para aptámeros de forma corta de PDGF-AA de la invención se presentan en la Tabla 11.

5

Tabla 11: información de secuencia para aptámeros de PDGF-AA (forma corta)

ARX33P1.D1 (SEC ID N°: 77)

**GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCGCCAGGAGCAAAGUCACGGAGGAGUG
GGGGUACGAAUGCUCGCCAGAGACCAACCGAGAA**

10 ARX33P1.D2 (SEC ID N°: 78)

**GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACCGGGAACUCGGAUUCUUCGCAUGUGGA
UGCGAUCAGUAUGCUCGCCAGAGACCAACCGAGAA**

ARX33P1.E5 (SEC ID N°: 79)

**GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACCGGGAACUCGGAUUCUUCACAUGUGGA
UGUGAUCAGUAUGCUCGCCAGAGACCAACCGAGAA**

ARX33P1.E10 (SEC ID N°: 80)

**GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACCGGGAACUCGGAUUCUUCGCAUGUGGA
UGCGAUCAGUAUGCUCGCCAGAGACCAACCGAGAA**

15

ARX33P1.E11 (SEC ID N°: 81)

**GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAGUGGAGGAGGUAUGUAUGGUUUGUG
CGUCUGGUGCGGUGCUCGCCAGAGACCAACCGAGAA**

Ensayos basados en células con aptámeros de PDGF-AA

20

Los aptámeros de PDGF-AA que mostraron unión *in vitro* se ensayaron en el ensayo de proliferación de 3T3 con respecto a su capacidad para inhibir la proliferación de células 3T3 inducida por PDGF-AA. El ensayo se preparó como se ha descrito previamente, usando una valoración del aptámero de PDGF-AA (0-1 μ M) frente a una concentración constante (50 ng/ml) de proteína PDGF-AA (R&D Systems). Los resultados de la Figura 24 muestran que los aptámeros de PDGF-AA ARX33P1.D2, ARX33P1.E5 y ARX33P1.E10 sí inhiben la proliferación de células 3T3 inducida por PDGF-AA, pero no son muy potentes. La Figura 25 muestra que los aptámeros de PDGF-AA no tienen ningún efecto en la proliferación de células 3T3 inducida por PDGF-BB, lo que indica que los aptámeros de PDGF-AA son altamente específicos para la isoforma PDGF-AA.

25

30

Habiéndose descrito ahora la invención por medio de descripción escrita y ejemplos, los expertos en la materia reconocerán que la invención puede practicarse en diversas realizaciones y que la descripción y ejemplos anteriores son para fines de ilustración y no limitación de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un aptámero que se une con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer en un paciente, en donde el aptámero comprende una estructura de secuencia de nucleótidos:

dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 70),

dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 71),

dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 72);o

10

dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 73)

en las que d = desoxi, m = 2'-O-metilo, PEG = polietilenglicol.

- 15 2. Un aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer en un paciente, en donde el aptámero comprende una estructura de secuencia de nucleótidos:

dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 70),

dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 71),

dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 72);o

20

dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-
dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 73)

en las que d = desoxi, m = 2'-O-metilo, PEG = polietilenglicol.

- 25 3. El uso de la reivindicación 1 o aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de la reivindicación 2 en el que el tratamiento de cáncer implica:

- 30 - inhibir el crecimiento de un tumor;
- reducir la presión de líquido intersticial en un tumor sólido;
- aumentar la permeabilidad de un tumor sólido a un agente citotóxico;
- reducir la expresión constitutiva del factor de crecimiento derivado de plaquetas en un tumor; o
- reducir la angiogénesis y la neovascularización en un tumor sólido.

- 35 4. Un aptámero que se une con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) comprendiendo el aptámero una estructura de secuencia de nucleótidos:

dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG
 (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 70),
 dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG
 (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 71),
 5 dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-dTdGdAdTmCdCdTdGdGdG
 (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 72), o
 dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-dTdGdAdTmCdCdTdGdGdG
 (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 73)

10 en las que d = desoxi, m = 2'-O-metilo, PEG = polietilenglicol.

5. Un aptámero, uso o aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 comprendiendo el aptámero la estructura de secuencia de nucleótidos:

15 dCdCdCdAdGdGdCdTdAdCmG-PEG-dCdGdTdAmGdAmGdCdAmUmCmA-PEG-dTdGdAdTmCdCdTmGmGmG
 (SEC ID N°: 69-PEG-SEC ID N°: 40-PEG-SEC ID N°: 70)

en la que d = desoxi, m = 2'-O-metilo, PEG = polietilenglicol.

20 6. Un aptámero, uso o aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores comprendiendo el aptámero un resto de recubrimiento.

7. Un aptámero, uso o aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 6 comprendiendo el aptámero un recubrimiento de desoxitimidina invertido 3'.

25 8. Un aptámero, uso o aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores estando conjugado el aptámero con un polímero de alto peso molecular.

30 9. Un aptámero, uso o aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el polímero de alto peso molecular es polietilenglicol.

10. Un aptámero, uso o aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores estando conjugado el aptámero en su extremo 5' con un polietilenglicol de alto peso molecular.

35 11. Un aptámero, uso o aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 10 en el que el polietilenglicol de alto peso molecular es un polietilenglicol de 20 kDa.

40 12. Un aptámero, uso o aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 10 en el que el polietilenglicol de alto peso molecular es un polietilenglicol de 30 kDa.

13. Un aptámero, uso o aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 10 en el que el polietilenglicol de alto peso molecular es un polietilenglicol de 40 kDa.

45 14. Un aptámero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13 para uso en el tratamiento de una enfermedad en un paciente.

50 15. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un aptámero como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, o una sal del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15 comprendiendo además la composición farmacéutica una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente citotóxico.

55 17. Una composición farmacéutica que comprende un aptámero como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13 para uso en el tratamiento de una enfermedad en un paciente.

60 18. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con la reivindicación 17 comprendiendo la composición farmacéutica una cantidad eficaz de al menos un aptámero como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, o una sal del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con la reivindicación 18 comprendiendo además la composición farmacéutica una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente citotóxico.

65

20. Uso de un aptámero como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la preparación de una composición farmacéutica para administración simultánea o secuencial con un agente citotóxico para el tratamiento de cáncer en un paciente.
- 5 21. Uso de un agente citotóxico en la preparación de una composición farmacéutica para administración simultánea o secuencial con un aptámero como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para el tratamiento de cáncer en un paciente.
- 10 22. Uso de un aptámero como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la preparación de una composición farmacéutica que comprende un agente citotóxico para el tratamiento de cáncer en un paciente.
- 15 23. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 en el que la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de al menos un aptámero como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, o una sal del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 24. El uso de acuerdo con la reivindicación 23 en el que la composición farmacéutica comprende además una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente citotóxico.
- 25 25. Un aptámero como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13 para uso en un método de tratamiento de cáncer en un paciente, comprendiendo el método de tratamiento la administración simultánea o secuencial con un agente citotóxico.
- 30 26. Un agente citotóxico para uso en un método de tratamiento de cáncer en un paciente, comprendiendo el método de tratamiento la administración simultánea o secuencial con un aptámero como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13.
- 35 27. Agentes terapéuticos que contienen un aptámero como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13 y un agente citotóxico como un a preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de cáncer.
- 40 28. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de la reivindicación 25, agente citotóxico para uso en un método de tratamiento de cáncer de la reivindicación 26 o agentes terapéuticos para uso en el tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 27 en el que el tratamiento de cáncer implica inhibir el crecimiento de un tumor.
- 45 29. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de la reivindicación 25, agente citotóxico para uso en un método de tratamiento de cáncer de la reivindicación 26 o agentes terapéuticos para uso en el tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 27 en el que el tratamiento de cáncer implica reducir la presión de líquido intersticial en un tumor sólido.
- 50 30. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de la reivindicación 25, agente citotóxico para uso en un método de tratamiento de cáncer de la reivindicación 26 o agentes terapéuticos para uso en el tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 27 en el que el tratamiento de cáncer implica aumentar la permeabilidad de un tumor sólido a un agente citotóxico.
- 55 31. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de la reivindicación 25, agente citotóxico para uso en un método de tratamiento de cáncer de la reivindicación 26 o agentes terapéuticos para uso en el tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 27 en el que el tratamiento de cáncer implica reducir la expresión constitutiva del factor de crecimiento derivado de plaquetas en un tumor.
- 60 32. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de la reivindicación 25, agente citotóxico para uso en un método de tratamiento de cáncer de la reivindicación 26 o agentes terapéuticos para uso en el tratamiento de cáncer de acuerdo con la reivindicación 27 en el que el tratamiento de cáncer implica reducir la angiogénesis y la neovascularización en un tumor sólido.
- 65 33. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24 o 28 a 32, aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 o 28 a 32, agente citotóxico para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 32 o agentes terapéuticos para uso en el tratamiento de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32 en el que el agente citotóxico es un estabilizador de tubulina, un desestabilizador de tubulina, un antimetabolito, un inhibidor de síntesis de purina, un análogo de nucleósido, un agente alquilante de ADN, un agente modificador de ADN o un agente alterador vascular.
34. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24 o 28 a 32, aptámero para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las

5 reivindicaciones 25 o 28 a 32, agente citotóxico para uso en un método de tratamiento de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28 a 32 o agentes terapéuticos para uso en el tratamiento de cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32 en el que el agente citotóxico es caliqueamicina, doxorubicina, taxol, metotrexato, gemcitabina, citarabina, vinblastina, daunorrubicina, docetaxel, irinotecán, epotilona B, epotilona D, cisplatino, carboplatino o 5-fluoro-U.

35. Uso de un aptámero como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad en un paciente.

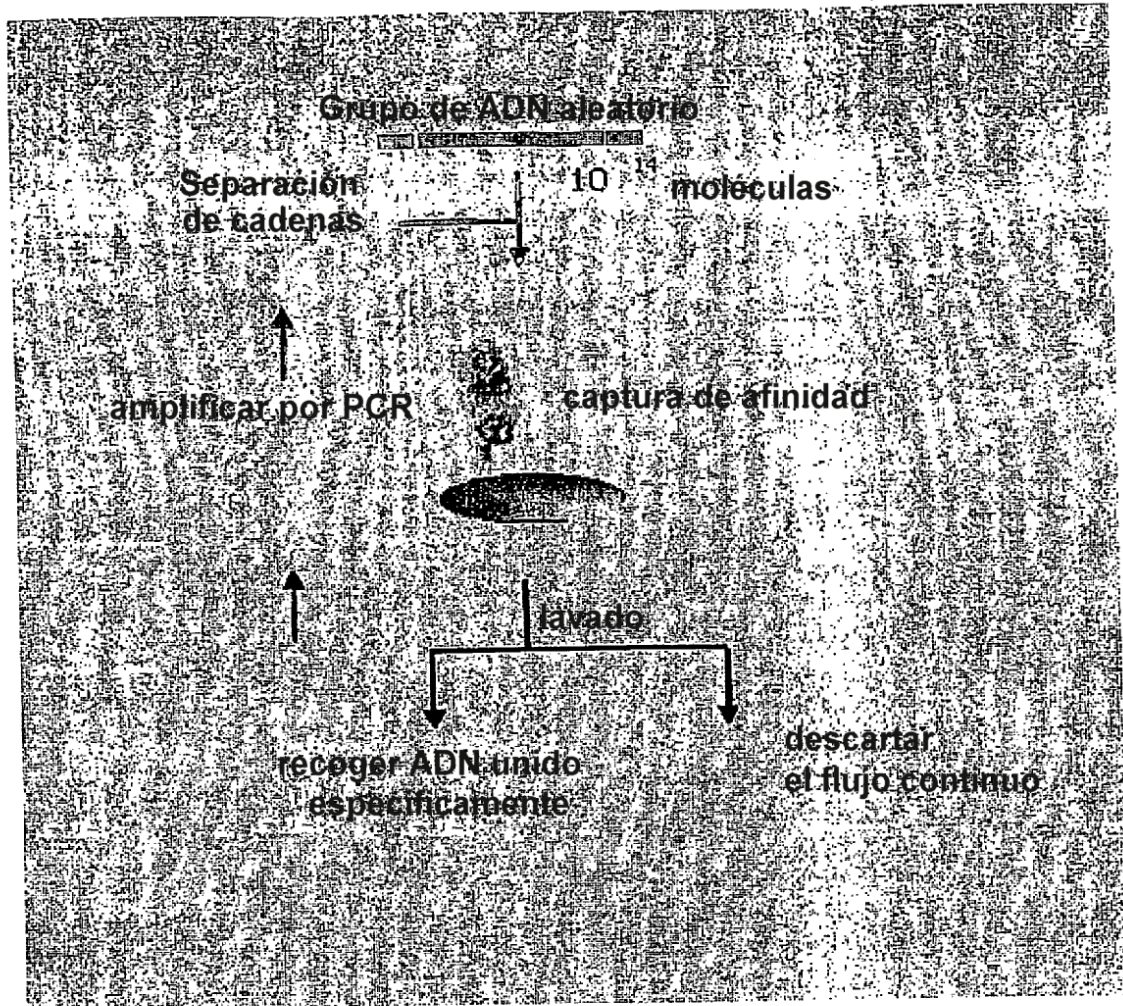


Figura 1

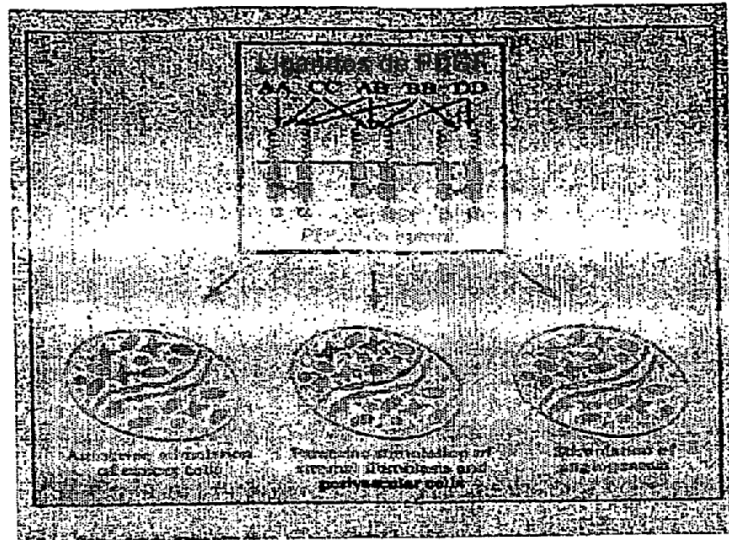


Figura 2

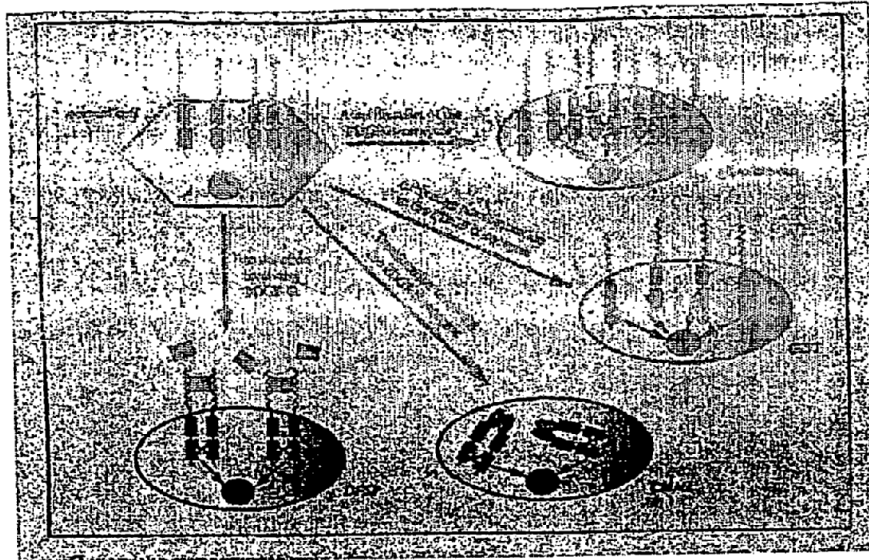


Figura 3

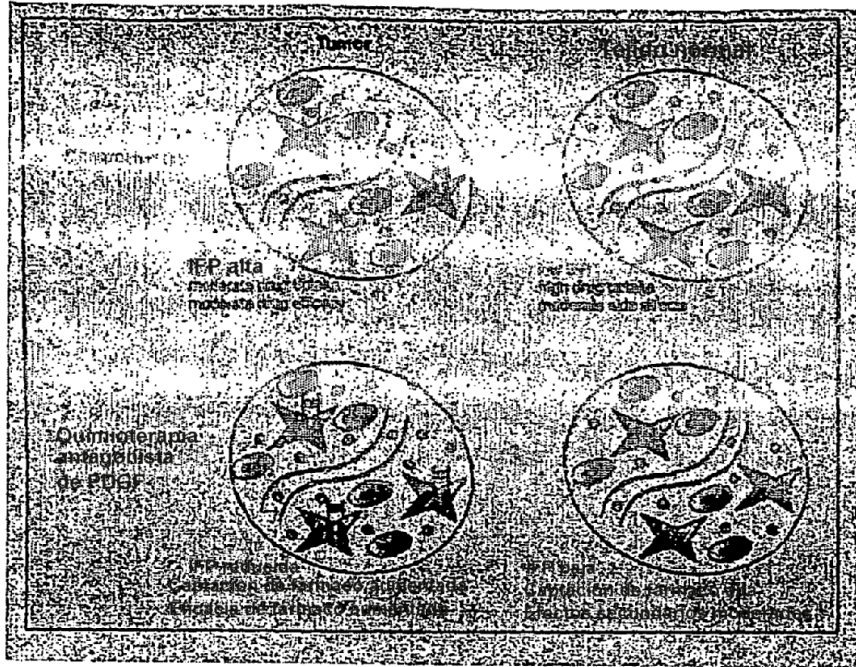


Figura 4

Figura 5A

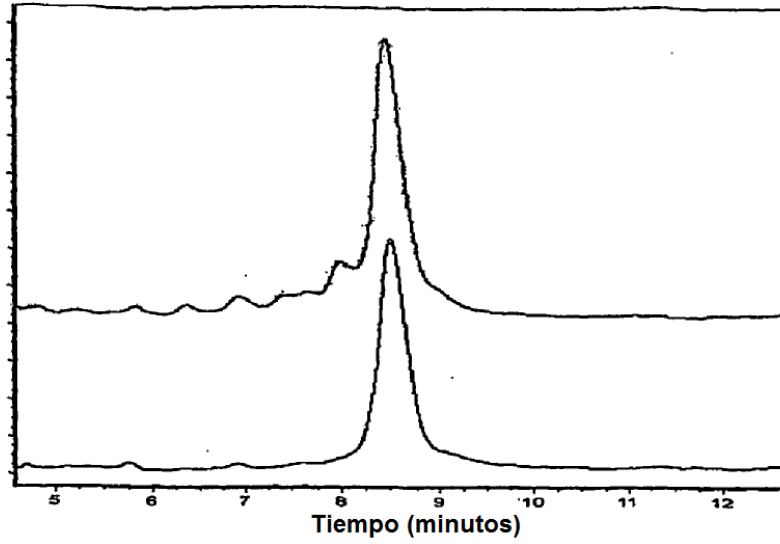
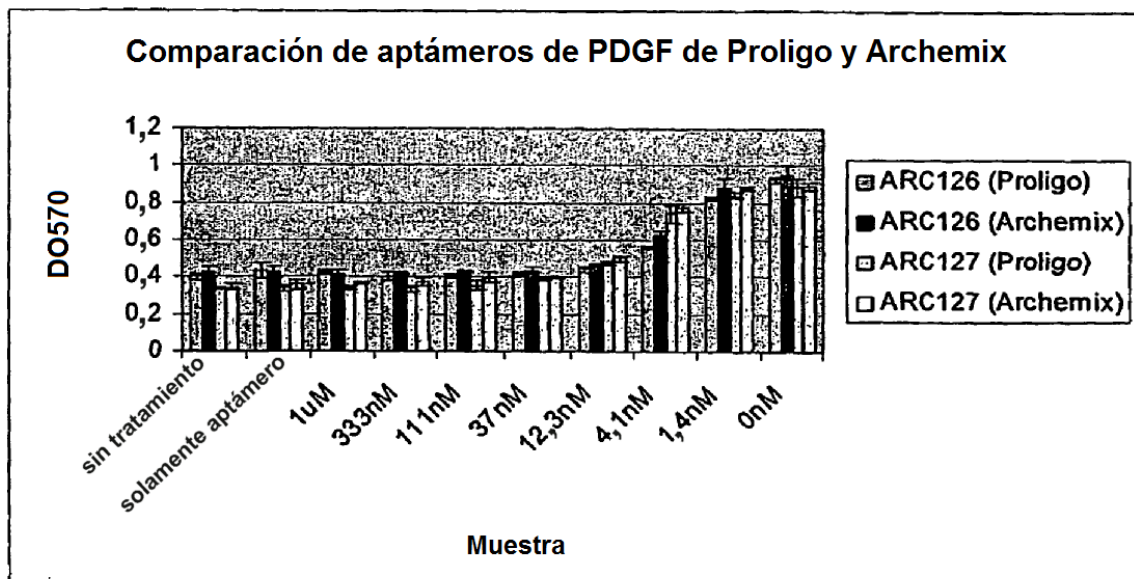


Figura 5B



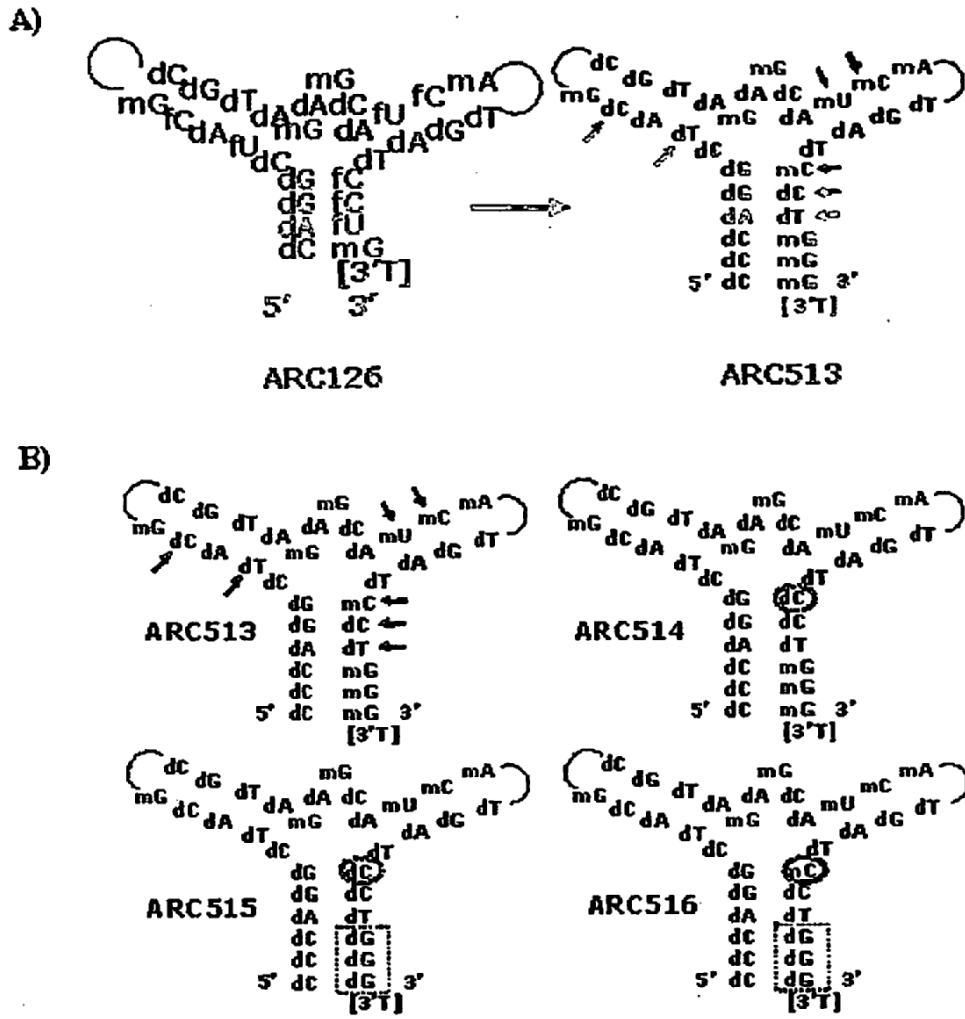
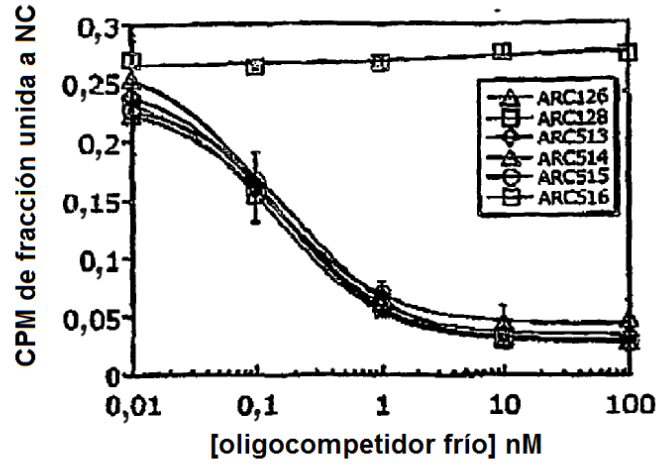


Figura 6

A)



B)

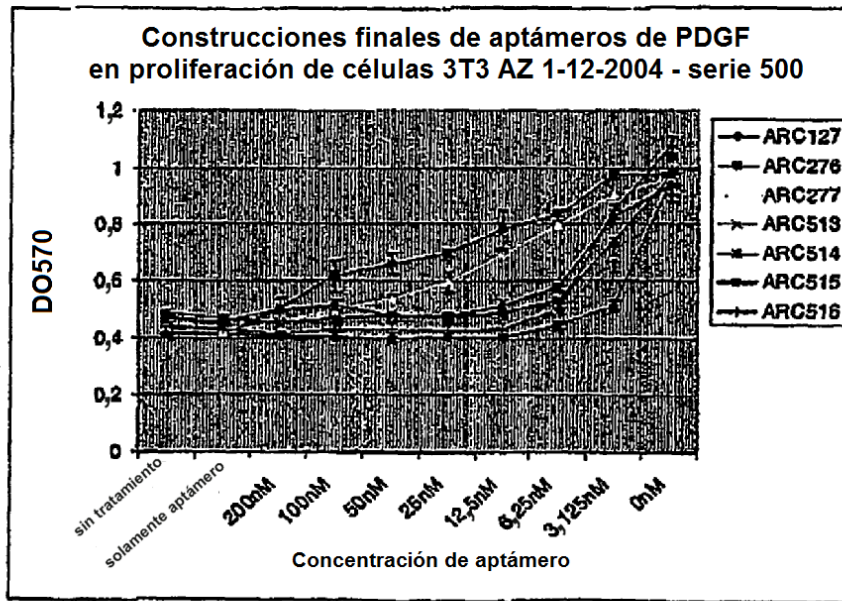
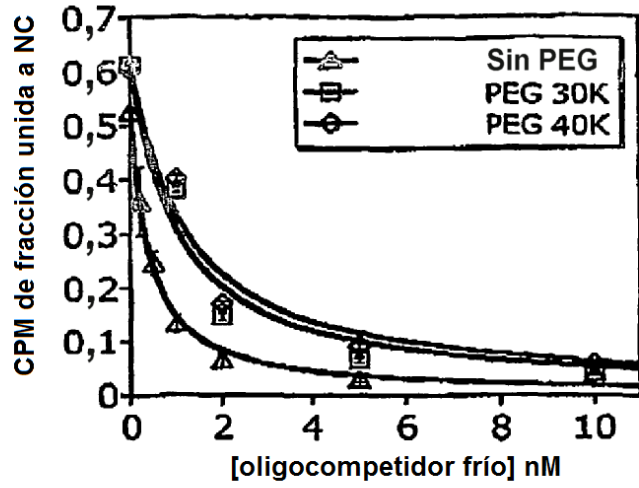


Figura 7

A)



B)

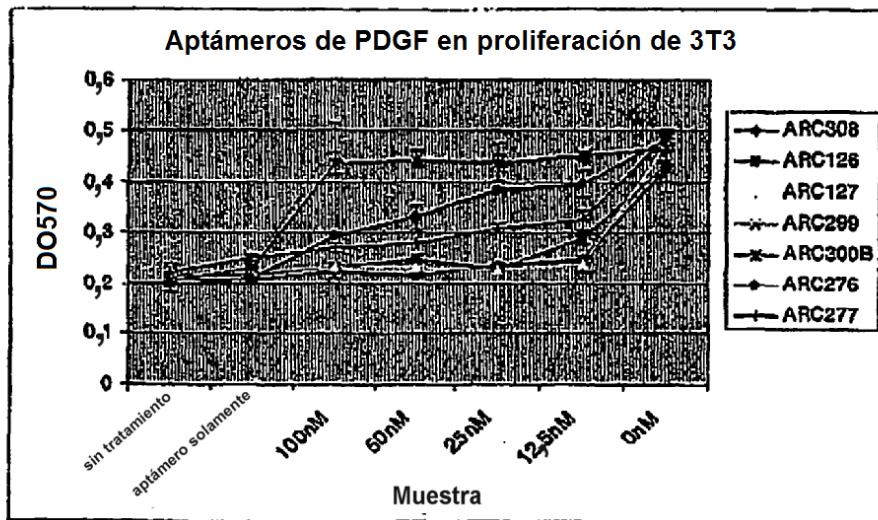


Figura 8

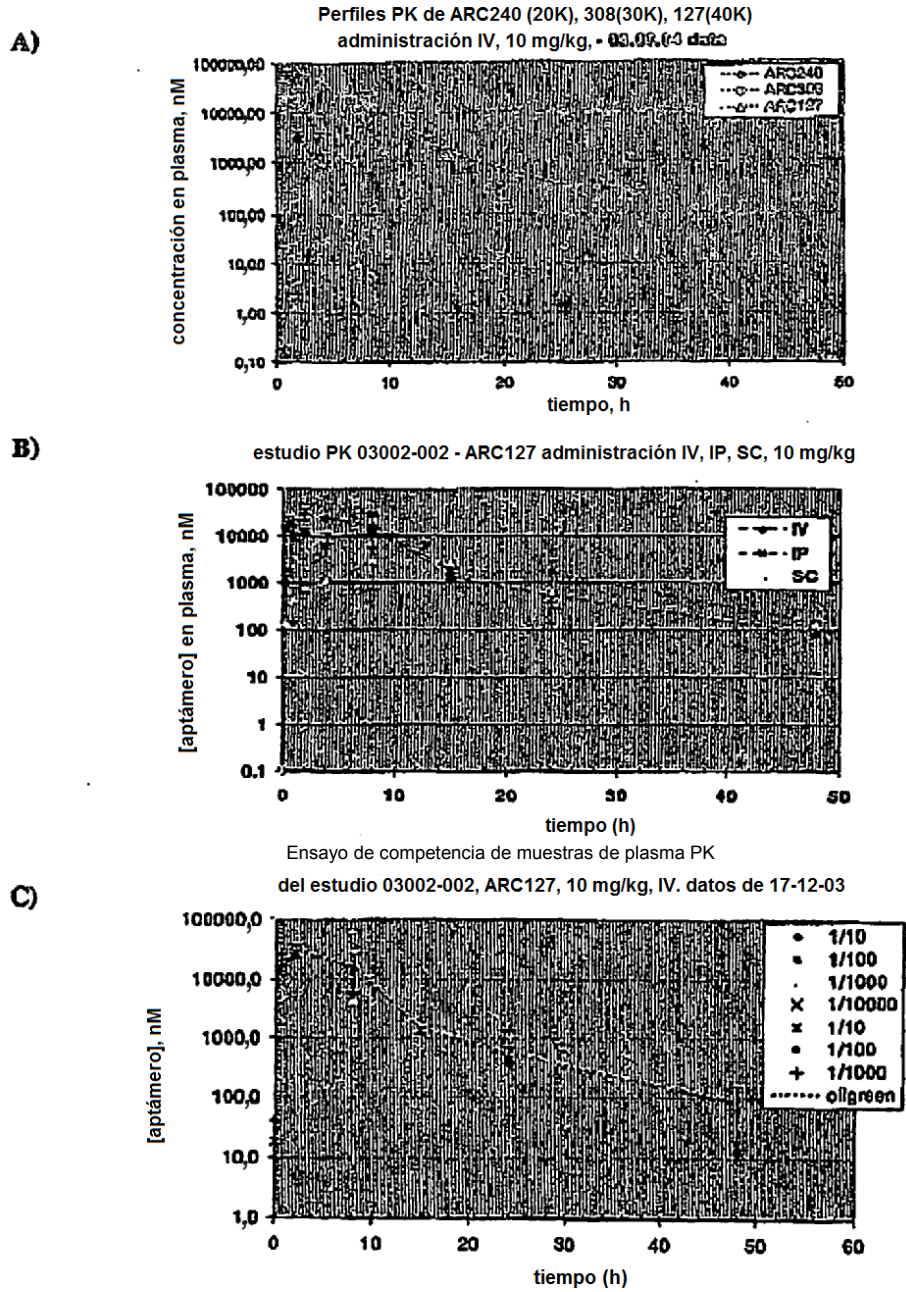
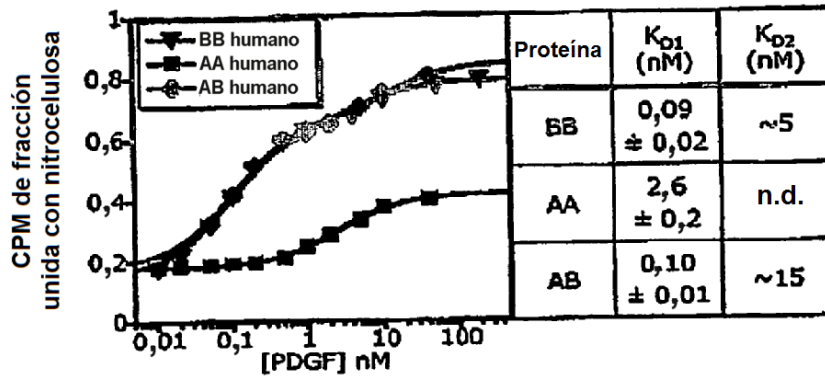


Figura 9

A)



B)

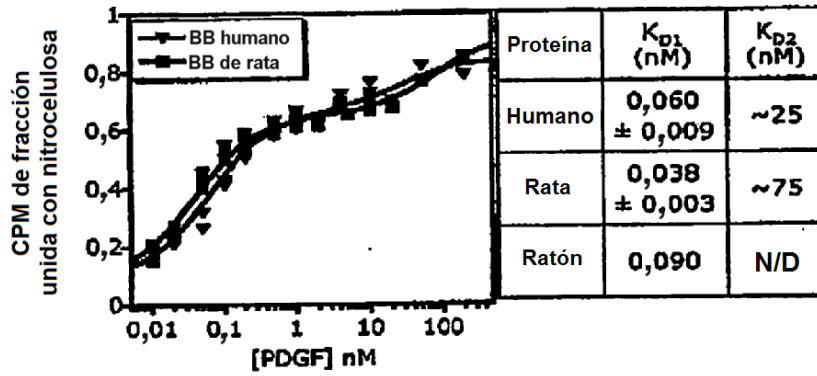
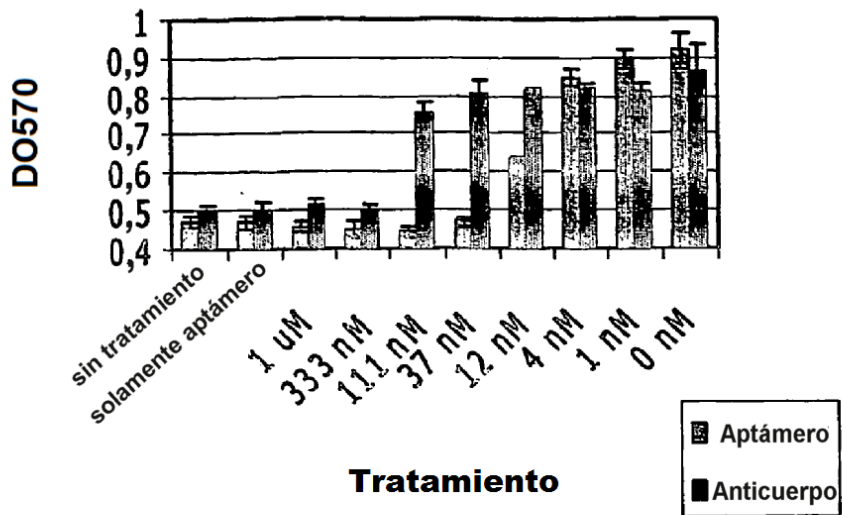


Figura 10

A)



B)

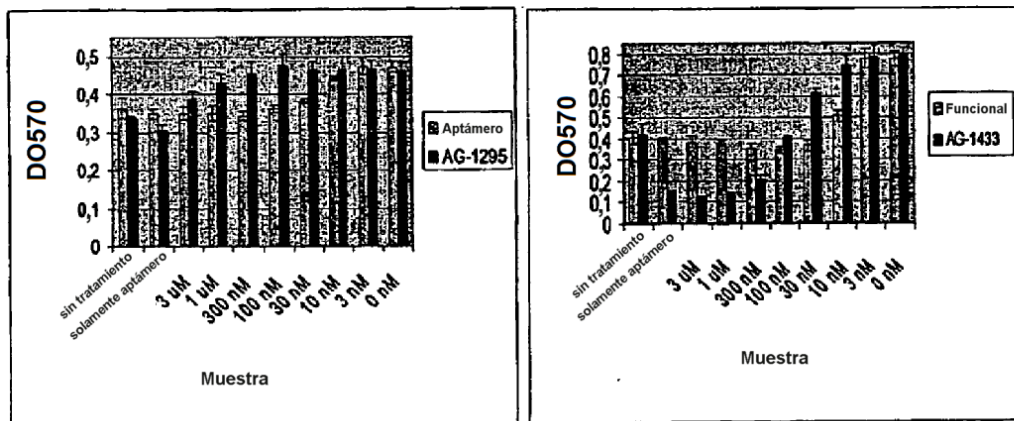


Figura 11

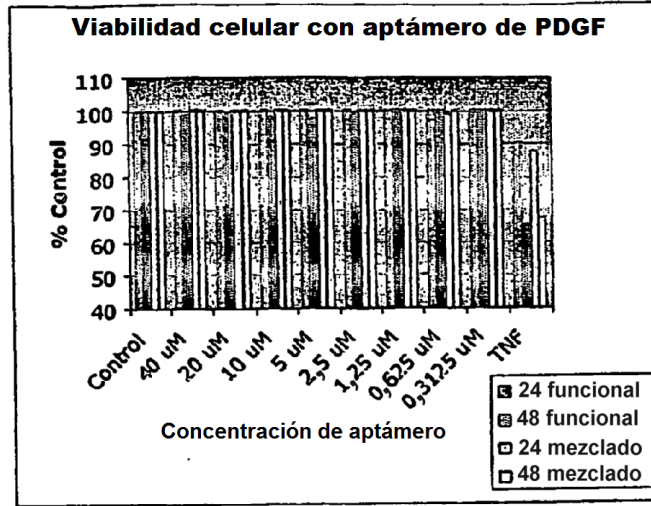


Figura 12

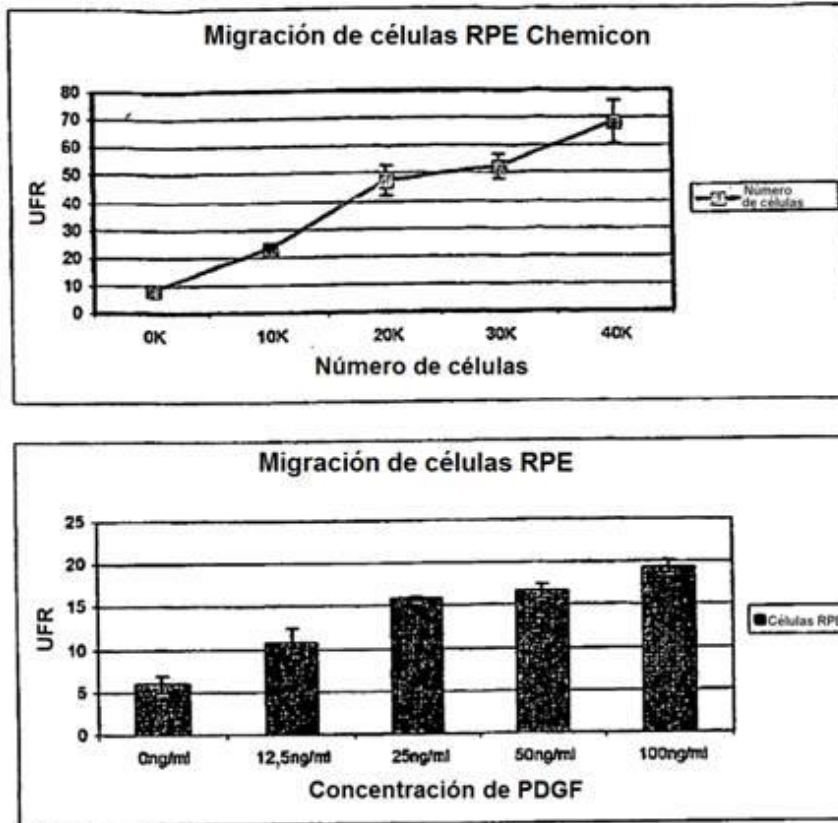


Figura 13

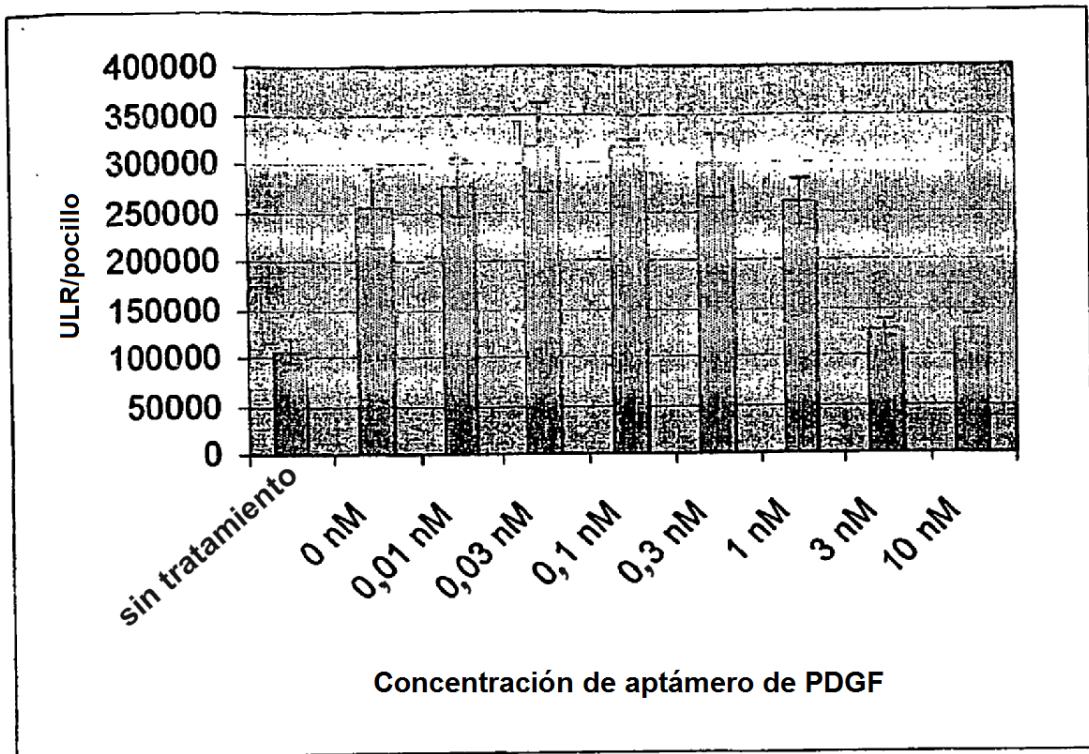


Figura 14

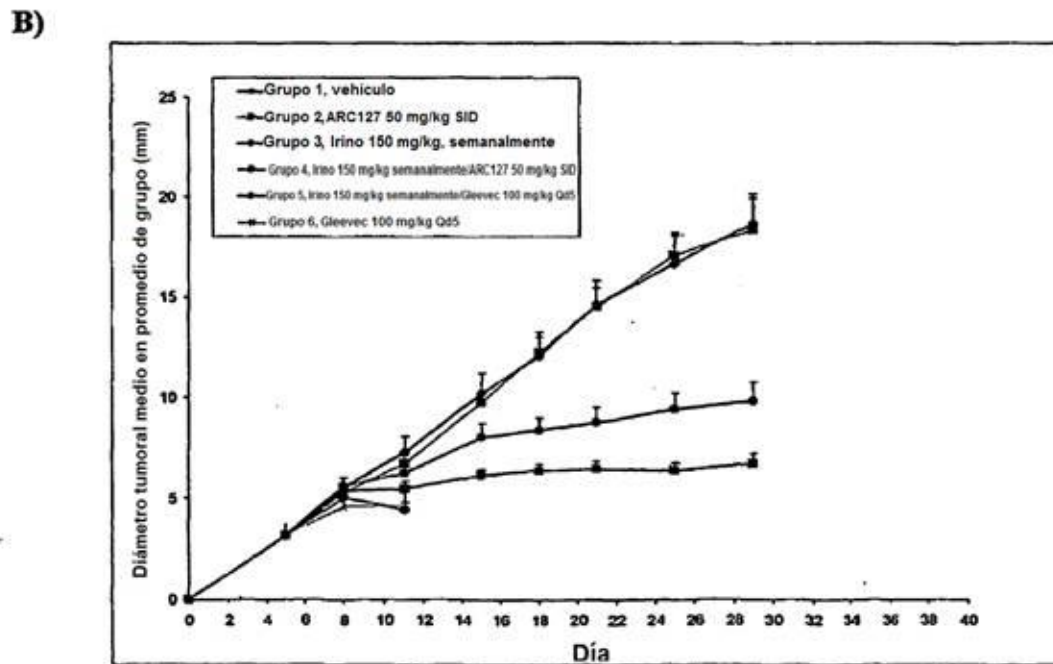
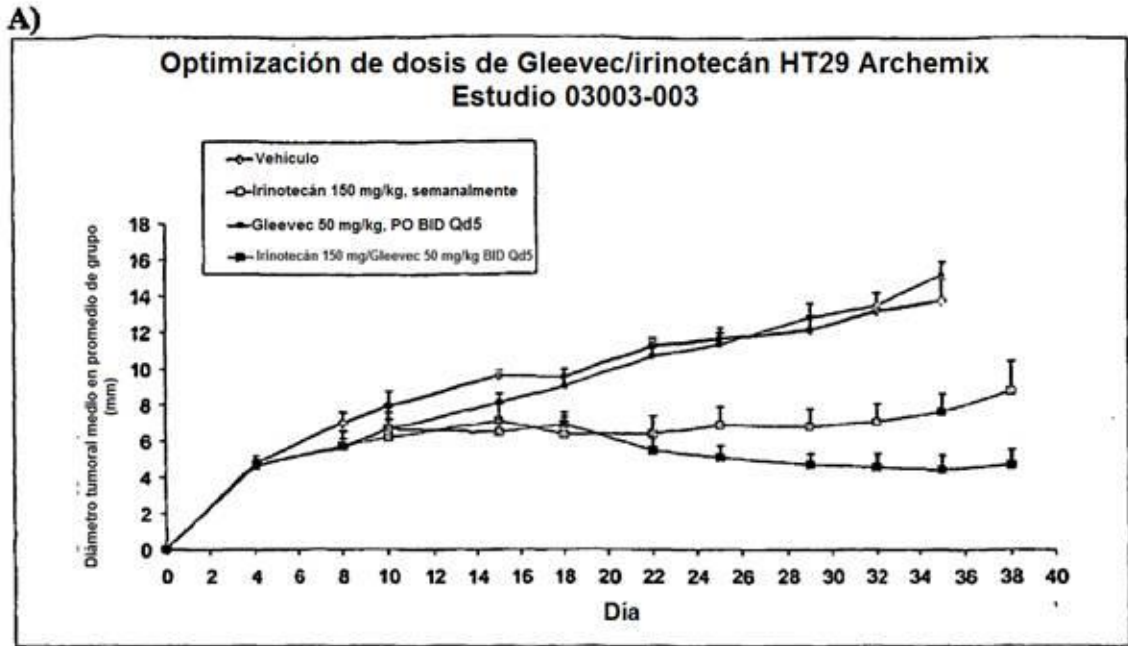


Figura 15

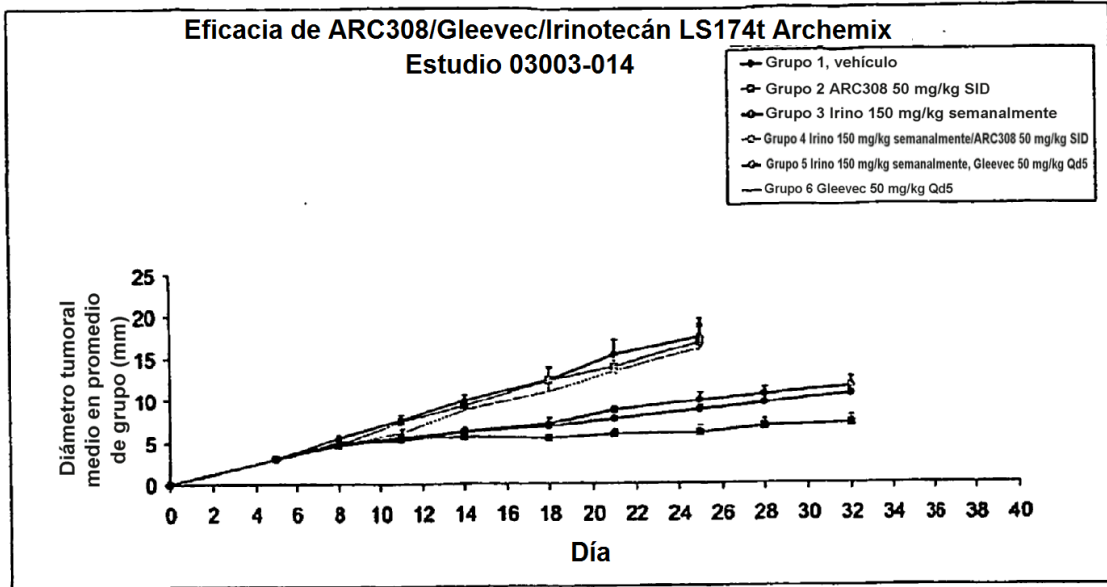
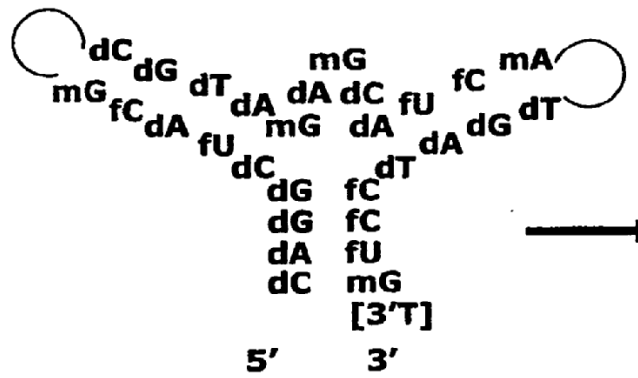


Figura 16

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 17A



ARC126

Figura 17B

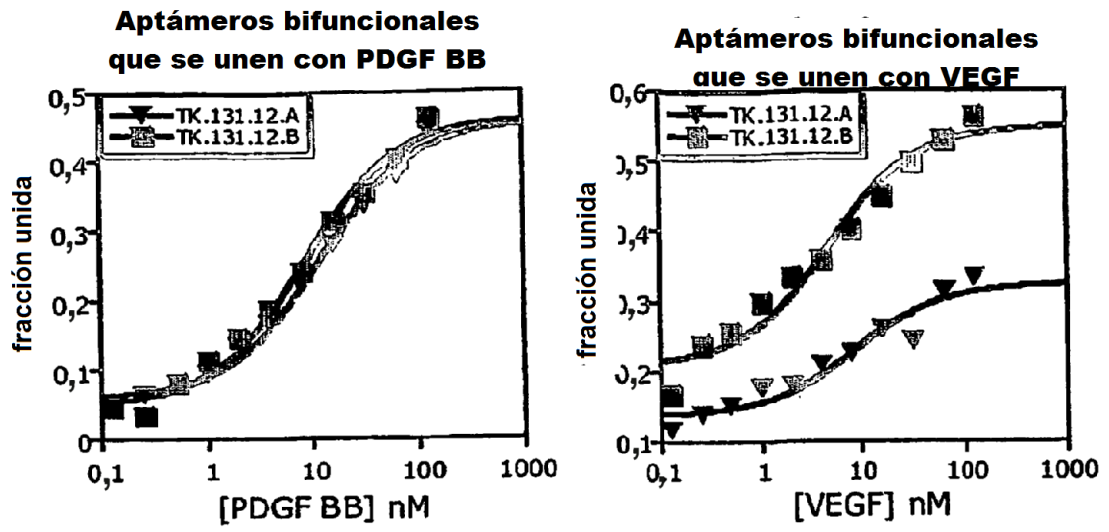


Figura 19

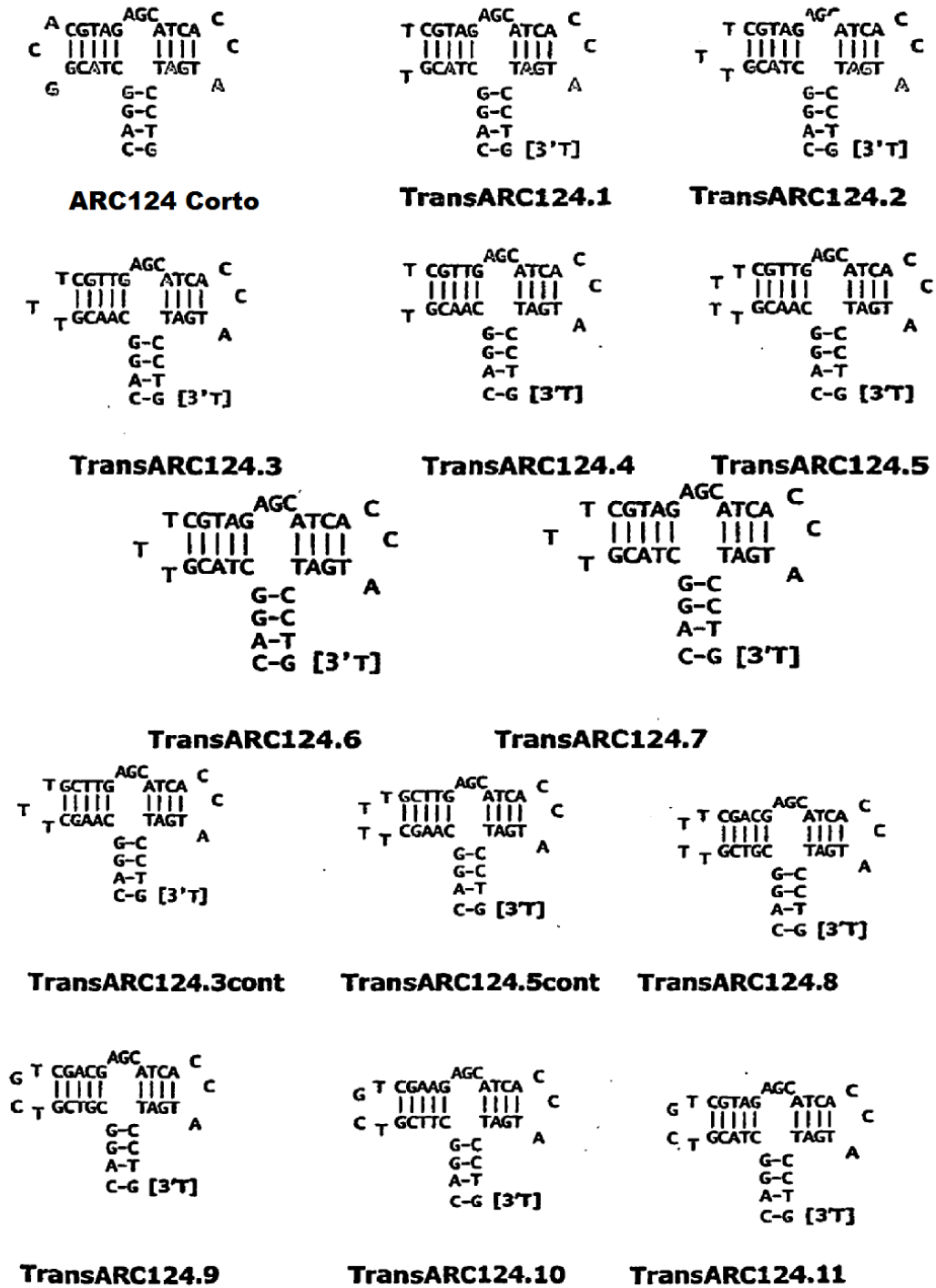
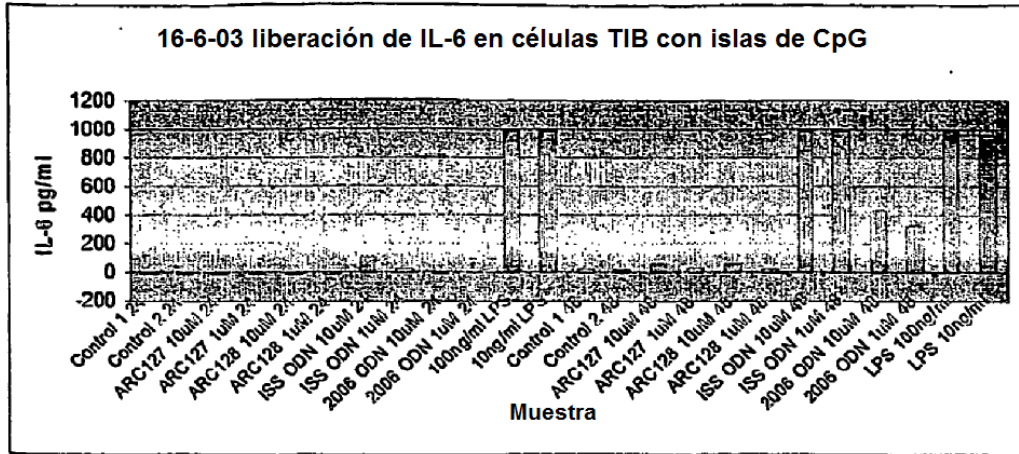
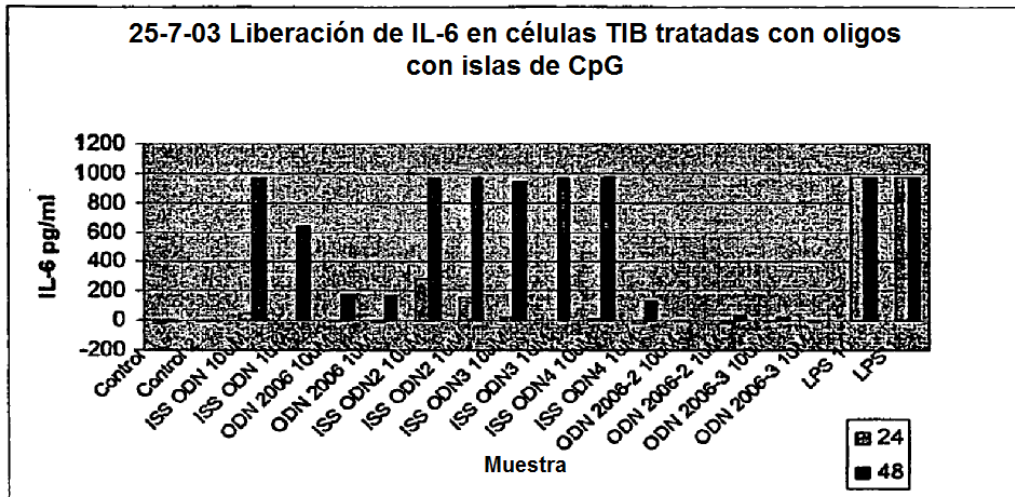


Figura 20

A)



B)



C)

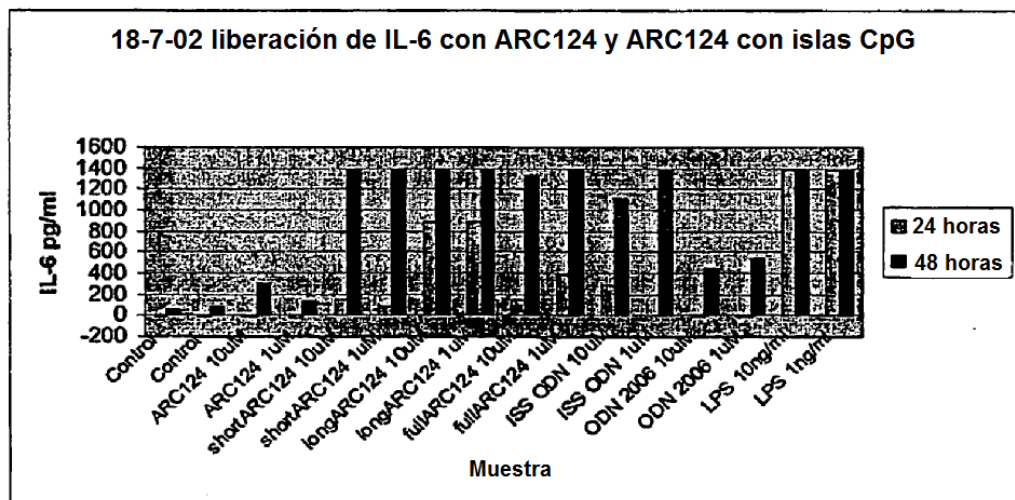
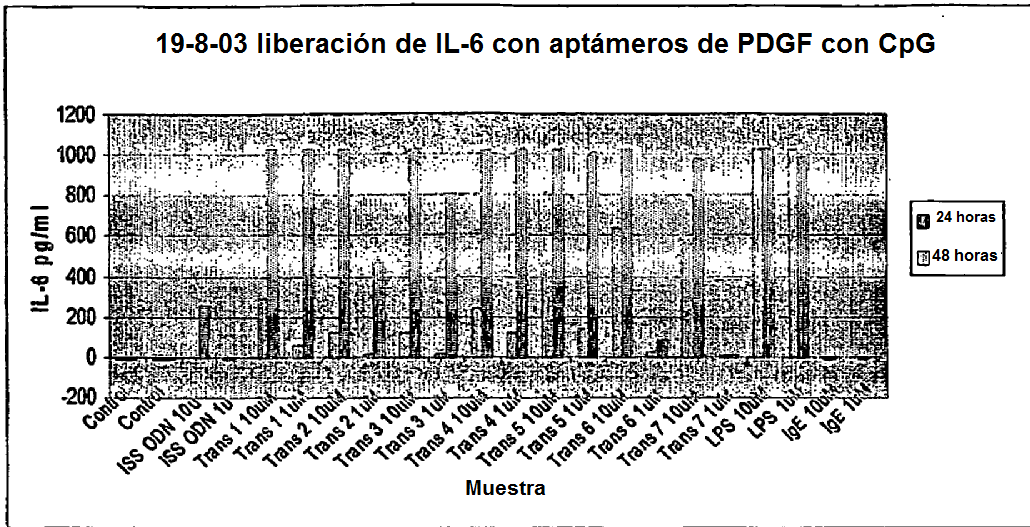


Figura 21

D)



E)

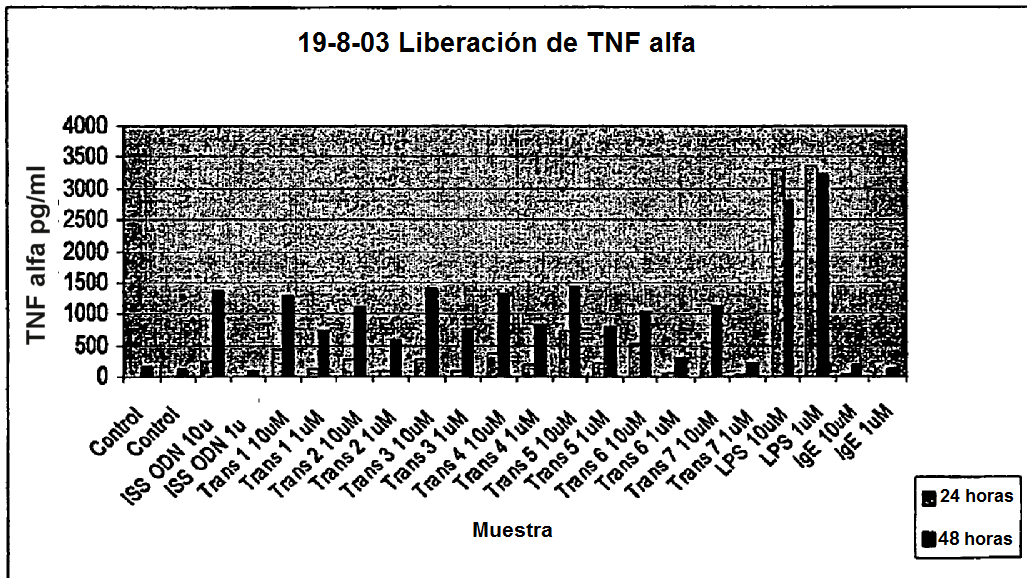
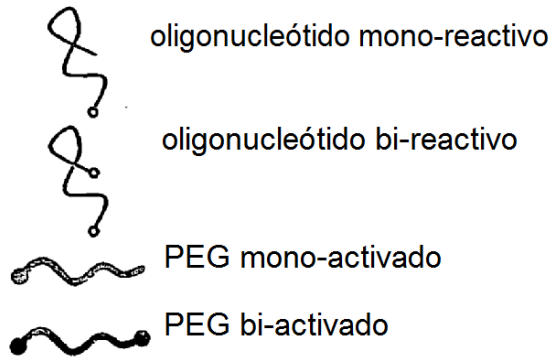
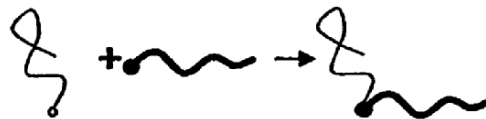


Figura 21 (continuación)

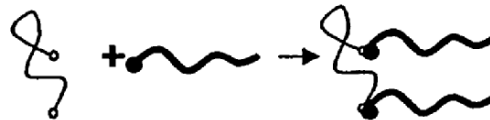
Figura 22



PEGilación convencional



PEGilación múltiple



Dimerización mediante PEGilación

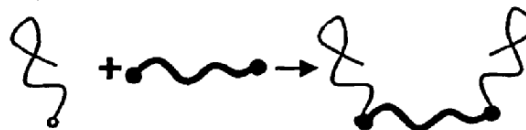


Figura 23A

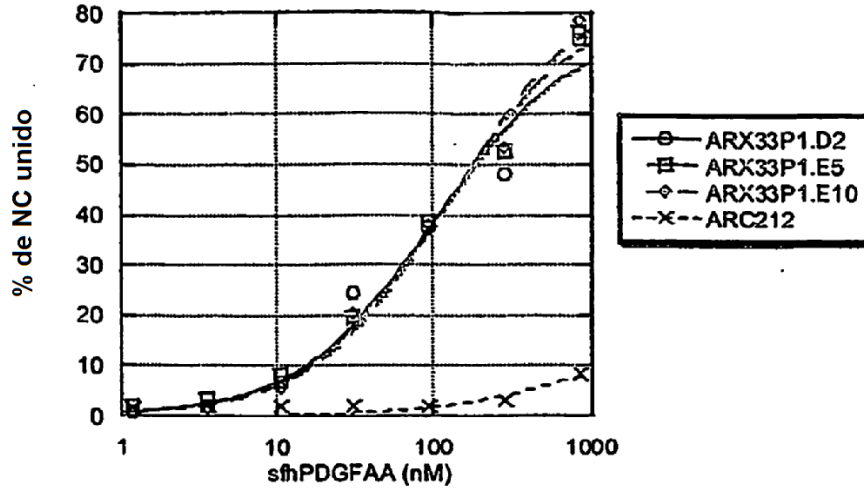


Figura 23B

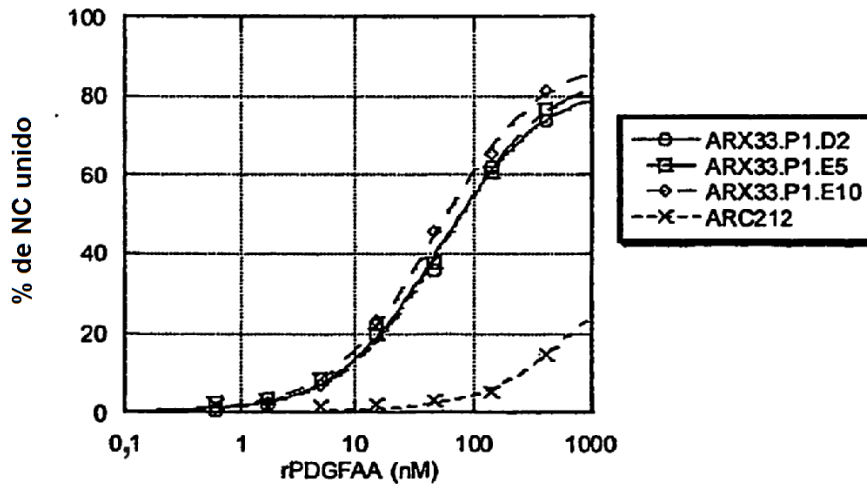


Figura 24

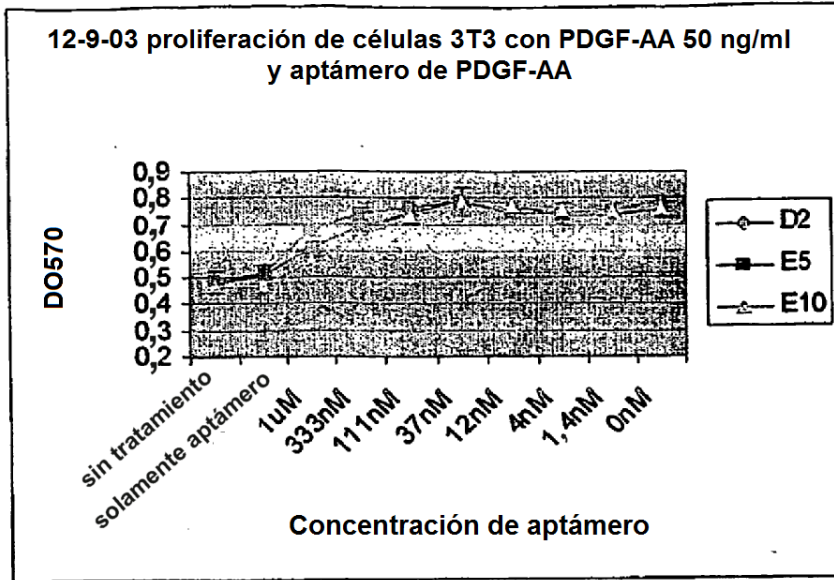


Figura 25

