

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 354**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2015 PCT/GB2015/051812**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15198024**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2015 E 15732901 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3158068**

54 Título: **Aptámeros contra EGFR y sus usos terapéuticos**

30 Prioridad:

23.06.2014 GB 201411150

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

10.09.2019

73 Titular/es:

**AVVINITY THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
8100 Cambridge Research Park
Waterbeach, Cambridge CB25 9TL, GB**

72 Inventor/es:

**HALL, BRADLEY y
HATALA, PAUL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 724 354 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 contra EGFR y sus usos terapéuticos

Campo de la invención

5 La invención se refiere a nuevos aptámeros; en particular, aptámeros que son capaces de unirse a EGFR. La invención también se refiere a complejos de unión a células cancerosas que comprenden dichos aptámeros y al uso de dichos complejos de unión a células cancerosas en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer es un grupo de enfermedades que involucran el crecimiento celular anormal con el potencial de invadir o propagarse a otras partes del cuerpo. En 2012, el cáncer fue padecido por aproximadamente 14,1 millones de personas. Causó alrededor de 8,2 millones de muertes o el 14,6% de todas las muertes humanas. Los tipos más comunes de cáncer en los hombres son el cáncer de pulmón, el cáncer de próstata, el cáncer colorrectal y el cáncer de estómago. En las mujeres, los tipos más comunes son el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y el cáncer de cuello uterino.

15 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), también conocido como ErbB-1 o HER1 en humanos, es el receptor de la superficie celular para los miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (familia EGF) de ligandos de proteínas extracelulares. El EGFR es un miembro de la familia de receptores ErbB, una subfamilia de cuatro tirosina quinasas receptoras estrechamente relacionadas: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) y Her 4 (ErbB-4).

20 Las mutaciones que afectan a la expresión o actividad de EGFR podrían dar como resultado cánceres. En particular, las mutaciones que conducen a una sobreexpresión de EGFR (conocida como regulación positiva) o hiperactividad se han asociado con una serie de cánceres, entre los que se incluyen el cáncer de pulmón, los cánceres anales (como el cáncer colorrectal) y el glioblastoma multiforme. Estas mutaciones somáticas que involucran EGFR conducen a su activación constante, lo que produce una división celular incontrolada. En el glioblastoma a menudo se observa una mutación más o menos específica de EGFR, llamada EGFRvIII. Las mutaciones, amplificaciones o errores de regulación de EGFR o los miembros de la familia están implicados en aproximadamente el 30% de todos los cánceres epiteliales.

25 Un enfoque innovador para el tratamiento del cáncer se describió en el documento WO 2005/079423 que se refiere a un enlazador de inmunidad que contiene dos restos de unión. El primer resto de unión es capaz de unirse a un componente de respuesta inmune de un individuo. El segundo resto de unión es capaz de unirse a cualquier compuesto o material extraño, como antígenos, patógenos, agentes químicos o materiales endógenos, como células alteradas encontradas en el cáncer. El efecto resultante de dicha molécula enlazadora de inmunidad es que la respuesta inmunitaria del individuo se desvía de la respuesta inmunitaria preexistente de dicho individuo hacia la diana, es decir, la célula cancerosa. Los ejemplos de dichos primeros restos de unión incluyen compuestos o agentes que son reconocidos por el sistema inmune de dicho individuo como extraños y que, por lo tanto, desencadenan una respuesta inmune. Un ejemplo es el epítipo alfa-Gal (es decir, galactosil-alfa-1,3-galactosil-beta-1,4-N-acetilglucosamina) que da como resultado la redirección del anticuerpo de suero humano natural anti-alfa-galactosilo. Los ejemplos de dichos segundos restos de unión incluyen anticuerpos y aptámeros. Los aptámeros son moléculas de ácido oligonucleico o péptido que se unen a una molécula diana específica. El principio del método descrito en el documento WO 2005/079423 es que el segundo resto de unión (es decir, el aptámero) de la molécula enlazadora se unirá a un epítipo en una célula cancerosa y la presencia del primer resto de unión (es decir, el epítipo alfa-Gal) en la molécula de enlace producirá una respuesta inmune en la célula cancerosa que originará una destrucción efectiva de la célula cancerosa.

30 En Li et al (2011) PLoS One 6(6), 1-9 se describen una serie de aptámeros anti-EGFR, incluido E07. Una disertación fue presentada por Viswatej Avutu en 2011 (https://repositories.lib.utexas.edu/bitstream/handle/2152/13407/Avutu-Bioch_10.pdf?secuencia=2) que describe una variante minimizada de E07 conocida como MinE07 que tiene la siguiente secuencia: 5'-rGrGrA fCrGrG rAfUfU fUrArA fUfCrG fCfCrG fUrArG rArArA rArGfC rAfUrG fUfCrA rArArG fCfCrG rGrArA fCfCrG fUfCfC-3' (SEQ ID NO: 85), donde "r" representa un nucleótido natural 2'-OH (ARN) y "f" representa un nucleótido 2'-fluoro modificado. En esta secuencia, hay de 28 de 48 nucleótidos no modificados que pueden conducir a la degradación de las nucleasas cuando se administran terapéuticamente.

35 Por lo tanto, existe una gran necesidad de aptámeros terapéuticamente eficaces alternativos que no solo retengan la capacidad de unirse a los epítopos presentes en las células cancerosas, sino que también sean capaces de soportar la degradación. Tales aptámeros tendrán una gran utilidad en la unión de complejos con agentes capaces de unirse a un componente de respuesta inmune de un individuo para proporcionar terapias eficaces contra el cáncer.

Sumario de la invención

55 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ácido ribonucleico que comprende la secuencia de nucleótidos:

5'-mGmG mG mAfUfU fUAA fUfCmG fCfCmG fUmAmG AmAmA AmGfC mAfUmG fUfCmA AAmG fCfCmG mGmAA fCfCfC-3' (ALT102139.01) (SEQ ID NO: 79), donde "m" representa un nucleótido 2'-O-metil sustituido y "f" representa un nucleótido 2'-fluoro sustituido.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un complejo de unión a células cancerosas que comprende un aptámero de la invención conjugado, o unido de otra manera, a una molécula inmunogénica.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un complejo de unión a células cancerosas de la invención, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros agentes terapéuticos o profilácticos.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un complejo de unión a células cancerosas de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1 a 15 describen los resultados del análisis del ensayo de resonancia de plasmón de superficie (SPR) con los aptámeros descritos.

15 Las figuras 16 a 19 describen los resultados del análisis del ensayo de citometría de flujo con los aptámeros seleccionados descritos.

Las figuras 20 a 22 describen los resultados del análisis de ensayo de degradación en suero con los aptámeros modificados en 3' descritos.

Descripción detallada

20 De acuerdo con un primer aspecto de la descripción, se proporciona una molécula de ácido ribonucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de:

5'-X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉ U₁₀A₁₁A₁₂ U₁₃C₁₄G₁₅ C₁₆C₁₇G₁₈U₁₉A₂₀G₂₁A₂₂A₂₃A₂₄A₂₅G₂₆C₂₇A₂₈U₂₉G₃₀U₃₁C₃₂A₃₃A₃₄A₃₅G₃₆ C₃₇C₃₈G₃₉G₄₀A₄₁A₄₂C₄₃C₄₄X₄₅X₄₆X₄₇C₄₈-3' (SEQ ID NO: 1), en donde X₁, X₂, X₅, X₆ y X₄₅ están ausentes o G, X₃ y X₇ están ausentes o A, X₄ y X₄₇ están ausentes o C y X₈, X₉ y X₄₆ están ausentes o U, de modo que cuando X₇-X₉ están ausentes, al menos uno de X₁-X₆ también debe estar ausente; y

25 opcionalmente, en el que los grupos 2'-OH de uno o más nucleótidos, distintos de los nucleótidos 12 a 13, 17, 29, 31 a 32 y 34, pueden estar sustituidos por un grupo 2'-OMe; y

30 opcionalmente, en donde los grupos 2'-OH de uno o más de los nucleótidos A y G, distintos de los nucleótidos 34 y 35, pueden estar sustituidos por un grupo 2'-F, con la condición de que cuando cada uno de X₁-X₉ y X₄₅-X₄₇ esté presente, entonces, al menos un nucleótido debe contener una de dichas sustituciones o dicha molécula debe contener entre 1 y 15 nucleótidos adicionales.

Se ha encontrado sorprendentemente que un número significativo de aptámeros dentro del alcance de la SEQ ID NO: 1 se unen a células recombinantes EGFR y/o EGFR y, por lo tanto, proporcionan una diana prometedora para combinar aptámeros con grupos generadores de respuesta inmune para el tratamiento del cáncer (como se establece en el documento WO 2005/079423).

35 La intención de la condición dentro del primer aspecto de la invención es excluir los aptámeros E07 y MinE07 conocidos. La intención del requisito de sustituciones posicionales específicas por 2'-OMe y 2'-F y que cuando X₇-X₉ estén ausentes, entonces al menos uno de X₁-X₆ también debe estar ausente, dentro del primer aspecto de la descripción, es excluir los aptámeros no vinculantes.

Se apreciará que la numeración mencionada en la SEQ ID NO: 1 se refiere a las posiciones de nucleótidos 1 a 48.

40 Modificaciones de aptámeros

El experto sabe que varias de dichas posiciones de nucleótidos 1 a 48 pueden estar ausentes, por lo tanto, las secuencias de nucleótidos con menos de 48 nucleótidos son parte de la descripción.

Se apreciará que la sustitución 2'-OMe pueda estar presente en una o más o incluso en cada una de las posiciones 1 a 11, de 14 a 16, 18 a 28, 30, 33 y de 35 a 48.

45 En un caso adicional, la sustitución 2'-OMe está presente en una o más o incluso cada una de las posiciones 1 a 9, de 15 a 16, 18 a 21, 23-24, 26-28, 30, 33 y 36-41. Estas posiciones proporcionan la ventaja de demostrar un buen nivel de unión a la proteína recombinante EGFR a partir de los datos de SPR proporcionados en este documento.

En un ejemplo alternativo, la sustitución 2'-OMe está presente en una o más o incluso en cada una de las posiciones 1 a 3, de 5 a 7, 15, 18, de 20 a 21, 23 a 24, 26, 28, 30, 33, 36, y de 39 a 41.

En un caso adicional, la sustitución 2'-F está presente en una o más o incluso cada una de las posiciones 2 a 3, 5 a 7, 11, 15, 20 a 26, 28, 33, 36 y 39 a 41. Estas posiciones proporcionan la ventaja de demostrar un buen nivel de unión a la proteína recombinante EGFR a partir de los datos de SPR proporcionados en este documento.

5 También se apreciará que cualquiera de los casos mencionados anteriormente de las sustituciones 2'-OMe puede combinarse con cualquiera de las ausencias mencionadas anteriormente de X₁-X₉ y X₄₅-X₄₇. Por ejemplo, en un caso, X₃-X₅ y X₄₅-X₄₇ están ausentes, X₁, X₂ y X₆ son G, X₇ es A, X₈ y X₉ son U, la sustitución 2'-OMe está presente en una o más o incluso en cada una de las posiciones 1 a 2, 6 a 7, 15, 18, 20 a 21, 23 a 24, 26, 28, 30, 33, 36 y de 39 a 41 (es decir, las secuencias expuestas anteriormente en este documento con numeración basada en nucleótidos ausentes que se cuentan como presentes) y cada uno de los grupos 2'-OH de los nucleótidos C y U se modifican a un grupo 2'-F. En la invención, X₃-X₅ y X₄₅-X₄₇ están ausentes, X₁, X₂ y X₆ son G, X₇ es A, X₈ y X₉ son fU, la sustitución 2'-OMe está presente en cada una de las posiciones 1 a 2, 6 a 7, 15, 18, 20 a 21, 23 a 24, 26, 28, 30, 33, 36 y de 39 a 41 (es decir, las secuencias expuestas anteriormente en el presente documento con base en la numeración de nucleótidos ausentes contados como presentes) y cada uno de los grupos 2'-OH de los nucleótidos C y U se modifican en un grupo 2'-F, es decir, la molécula de ácido ribonucleico de la invención comprende la secuencia 5'-mGmG mG mAfUfU fUAA fUfCmG fCfCmG fUmAmG AmAmA AmGfC mAfUmG fUfCmA AAmG fCfCmG mGmAA fCfCfC-3' (ALT102139.01) (SEQ ID NO: 79). El aptámero de la invención mostró un nivel medio de unión (es decir, menor R_{max}) a la proteína recombinante EGFR a partir de los datos de SPR proporcionados en este documento (ver Figura 15, cuarta traza desde la parte superior) y un buen nivel de unión a dos tipos de células EGFR de los datos FACS proporcionados en este documento (ver la Figura 18 para la unión a células LN-18 y la Figura 19 para la unión a células A549).

En una realización, la molécula de nucleótido comprende adicionalmente una o más modificaciones adicionales, tales como una modificación de terminación 3'. En una realización, la modificación de terminación 3' comprende la adición de un nucleótido de timidina invertida (i-dT) en el extremo 3' de dicha molécula de ácido ribonucleico. La conexión de fosfato 3'-3' no se reconoce fácilmente por las nucleasas y, por lo tanto, reduce la actividad de exonucleasa del extremo 3' del oligonucleótido que confiere estabilidad de nucleasa adicional. Esto está completamente descrito en L Beigelman et al (1995) J. Biol. Chem, 270, 25702-25708.

El experto sabrá que las secuencias de nucleótidos con más de 48 nucleótidos (pero no más de 63 nucleótidos, es decir, los 48 nucleótidos máximos de la SEQ ID NO: 1 más no más de 15 nucleótidos adicionales) también están dentro del alcance de la descripción. Por lo tanto, en una realización, la molécula de ácido ribonucleico comprende nucleótidos adicionales en el extremo 5' o 3'. Se apreciará que se puede agregar cualquier número de nucleótidos en el extremo 5' o 3', típicamente entre 1 y 15 nucleótidos, tal como entre 1 y 10 nucleótidos, en particular entre 1 y 5 nucleótidos, más particularmente entre 2 y 4 nucleótidos, por ejemplo 3 ó 4 nucleótidos. En una realización, los nucleótidos se añaden en el extremo 5'. En una realización adicional, los nucleótidos añadidos comprenden un motivo de nucleótido AAA o AAAG.

35 También se apreciará que cualquiera o todos los nucleótidos adicionales mencionados anteriormente pueden contener una sustitución 2'-OMe.

En la invención, la molécula de ácido ribonucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre: 5'-mGmG mG mAfUfU fUAA fUfCmG fCfCmG fUmAmG AmAmA AmGfC mAfUmG fUfCmA AAmG fCfCmG mGmAA fCfCfC-3' (ALT102139.01) (SEQ ID NO: 79)

40 Los aptámeros de la invención proporcionaron la ventaja de no solo demostrar la unión a la proteína EGFR recombinante sino también la unión a dos tipos de células EGFR (es decir, A431 y A549 o LN-18 y A549).

Síntesis de aptámeros

45 Será evidente para los expertos que los aptámeros de la invención pueden sintetizarse de acuerdo con técnicas dentro del conocimiento general común, tales como la síntesis de nucleótidos en fase sólida (CR Noe, L Kauffhold; Chemistry of Antisense Oligonucleótidos en New Trends in Synthetic Medicinal Chemistry, Ed: F Gualtieri; Wiley-VCH, Weinheim, 2000; pp 261-347. ISBN 3527297995).

Complejos de unión a células cancerígenas

50 Como se discutió en este documento anteriormente, los aptámeros de la invención proporcionan una diana prometedora para el tratamiento del cáncer al combinarlos con grupos generadores de respuesta inmune (como se expone en el documento WO 2005/079423). De este modo, según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un complejo de unión a células cancerosas que comprende un aptámero conjugado, o unido de otra manera, a una molécula inmunogénica. Los aptámeros de la invención proporcionan la ventaja de impartir una unión eficaz entre el complejo de unión de células cancerosas y las células cancerosas. Sinérgicamente, la presencia de la molécula inmunogénica en el complejo proporciona un medio para que el sistema inmunitario del individuo se dirija y destruya de manera específica y selectiva a las células cancerosas sin el efecto observador que se detecta en muchas terapias contra el cáncer donde se destruyen células normales y sanas.

Los ejemplos de moléculas inmunogénicas incluyen restos capaces de unirse a un componente de respuesta inmune de un individuo. En una realización, la molécula inmunogénica se selecciona de: el epítipo alfa-Gal (es decir, galactosil-alfa-1,3-galactosil-beta-1,4-N-acetilglucosamina), dinitrofenilo (DNP) y L-ramnosa. En una realización adicional más, la molécula inmunogénica es el epítipo alfa-Gal (es decir, galactosil-alfa-1,3-galactosil-beta-1,4-N-acetilglucosamina).

En una realización, está presente un espaciador entre el aptámero y la molécula inmunogénica. El espaciador proporciona la ventaja de permitir suficiente flexibilidad y posicionamiento estérico del complejo cuando se une a la célula cancerosa para permitir el reconocimiento y la unión del componente de respuesta inmune a la molécula inmunogénica. En una realización, el espaciador comprende una pluralidad de residuos de carbono, tales como más de 5, en particular 9 residuos de carbono. En una realización alternativa, el espaciador comprende uno o más grupos poliéter, tales como polietilenglicol.

Composiciones farmacéuticas

Si bien es posible que el complejo de unión de células cancerosas se administre solo, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica (por ejemplo, una formulación).

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica y métodos para preparar una composición farmacéutica que comprende (por ejemplo, mezclar) al menos un complejo de unión a células cancerosas, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos o profilácticos, como se describe en este documento.

El o los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden seleccionarse de, por ejemplo, vehículos (por ejemplo, un vehículo sólido, líquido o semisólido), adyuvantes, diluyentes, cargas o agentes de carga, agentes de granulación, agentes de recubrimiento, agentes de control de la liberación, agentes de unión, desintegrantes, agentes lubricantes, conservantes, antioxidantes, agentes tamponantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, agentes aromatizantes, edulcorantes, agentes enmascaradores del sabor, estabilizantes o cualquier otro excipiente utilizado convencionalmente en composiciones farmacéuticas. Los ejemplos de excipientes para diversos tipos de composiciones farmacéuticas se exponen con más detalle a continuación.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) sin excesiva toxicidad (es decir, generalmente reconocida como segura (GRAS)), irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, en proporción con una relación razonable de riesgo/beneficio. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas que contienen complejos de unión a células cancerosas se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas; ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, EE.UU.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma adecuada para su administración parenteral, intranasal, intrabronquial, sublingual, oftálmica, ótica, rectal, intravaginal o transdérmica. Cuando las composiciones están destinadas a la administración parenteral, pueden formularse para su administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o para la administración directa en un órgano o tejido diana mediante inyección, infusión u otros medios de administración. La administración puede ser mediante inyección en bolo, infusión a corto plazo o infusión a más largo plazo y puede ser por vía pasiva o mediante la utilización de una bomba de infusión adecuada o un dispositivo de inyección de jeringa.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos, co-disolventes, agentes tensioactivos, mezclas de disolventes orgánicos, agentes de complejación de ciclodextrina, agentes emulsionantes (para formar y estabilizar formulaciones de emulsión), componentes de liposomas para formar liposomas, polímeros gelificables para formar geles poliméricos, protectores de liofilización y combinaciones de agentes para, entre otros, estabilizar el ingrediente activo en una forma soluble y hacer que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado. Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral también pueden tomar la forma de suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes (RG Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations, Pharmaceutical Research, Vol 21 (2) 2004, p 201-230).

Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas selladas, viales y jeringas precargadas, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso.

La formulación farmacéutica se puede preparar liofilizando un complejo de unión a células cancerosas. La liofilización se refiere al procedimiento de liofilización de una composición. Por lo tanto, la liofilización o secado por congelación se usan en este documento como sinónimos.

Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la inyección parenteral también pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso.

10 Los ejemplos de vehículos, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (como aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de maíz o aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales espesantes o de recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

15 Las composiciones de la presente invención también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes para ajustar la tonicidad, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

20 En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica está en una forma adecuada para la administración i.v., por ejemplo, por inyección o infusión. Para la administración intravenosa, la solución se puede dosificar como está o se puede inyectar en una bolsa de infusión (que contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable, como solución salina al 0,9% o dextrosa al 5%), antes de la administración.

25 En otra realización preferida, la composición farmacéutica está en una forma adecuada para la administración subcutánea (s.c.).

30 El complejo de unión a células cancerosas puede formularse con un vehículo y administrarse en forma de nanopartículas, y el área de superficie aumentada de las nanopartículas ayuda a su absorción. Además, las nanopartículas ofrecen la posibilidad de penetración directa en la célula. Los sistemas de administración de fármacos con nanopartículas se describen en "Nanoparticle Technology for Drug Delivery", editado por Ram B Gupta y Uday B. Kompella, Informa Healthcare, ISBN 9781574448573, publicado el 13 de marzo de 2006. Las nanopartículas para la administración de fármacos también se describen en J. Control. Release, 2003, 91 (1-2), 167-172, y en Sinha et al., Mol. Cancer Ther. 1 de agosto (2006) 5, 1909.

35 Las composiciones farmacéuticas típicamente comprenden de aproximadamente 1% (p/p) a aproximadamente 95% (p/p) de ingrediente activo y de 99% (p/p) a 5% (p/p) de un excipiente o combinación farmacéuticamente aceptable de excipientes. Preferiblemente, las composiciones comprenden de aproximadamente 20% (p/p) a aproximadamente 90% (p/p) de ingrediente activo y de 80% (p/p) a 10% de un excipiente o combinación de excipientes farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 1% a aproximadamente 95%, preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 90% de ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden estar, por ejemplo, en forma de dosis unitaria, tal como en forma de ampollas, viales, supositorios, jeringas precargadas, grageas, comprimidos o cápsulas.

40 El o los excipientes farmacéuticamente aceptables se pueden seleccionar de acuerdo con la forma física deseada de la formulación y, por ejemplo, se pueden seleccionar entre diluyentes (por ejemplo, diluyentes sólidos tales como cargas o agentes de carga) y diluyentes líquidos tales como disolventes y codisolventes), desintegrantes, agentes tamponantes, lubricantes, auxiliares de flujo, agentes de control de la liberación (por ejemplo, retardantes o retardantes de la liberación o polímeros retardantes o ceras), aglutinantes, agentes de granulación, pigmentos, plastificantes, antioxidantes, conservantes, agentes aromatizantes, agentes de enmascaramiento del sabor, agentes de ajuste de tonicidad y agentes de recubrimiento.

45 El experto tendrá experiencia en seleccionar las cantidades adecuadas de ingredientes para usar en las formulaciones. Por ejemplo, las tabletas y cápsulas típicamente contienen 0-20% de desintegrantes, 0-5% de lubricantes, 0-5% de auxiliares de flujo y/o 0-99% (p/p) de agentes de relleno o de carga (según la dosis del medicamento). También pueden contener 0-10% (p/p) de aglomerantes de polímeros, 0-5% (p/p) de antioxidantes, 0-5% (p/p) de pigmentos. Los comprimidos de liberación lenta además contendrían 0-99% (p/p) de polímeros que controlan la liberación (por ejemplo, retraso) (según la dosis). Las capas de película de la tableta o cápsula contienen típicamente 0-10% (p/p) de polímeros, 0-3% (p/p) de pigmentos y/o 0-2% (p/p) de plastificantes.

55 Las formulaciones parenterales generalmente contienen 0-20% (p/p) tampones, 0-50% (p/p) cosolventes y/o 0-99% (p/p) agua para inyección (WFI) (dependiendo de la dosis y si están liofilizadas). Las formulaciones para depósitos intramusculares también pueden contener 0-99% (p/p) de aceites.

5 Los compuestos de la invención también pueden formularse como dispersiones sólidas. Las dispersiones sólidas son fases dispersas extremadamente finas y homogéneas de dos o más sólidos. Las soluciones sólidas (sistemas dispersos molecularmente), un tipo de dispersión sólida, son bien conocidas para su uso en tecnología farmacéutica (ver (Chiou y Riegelman, J. Pharm. Sci., 60, 1281-1300 (1971)) y son útiles para aumentar las velocidades de disolución y aumentar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua.

10 Las formulaciones farmacéuticas se pueden presentar a un paciente en "paquetes de pacientes" que contienen un curso completo de tratamiento en un solo paquete, generalmente un blíster. Los paquetes para pacientes tienen una ventaja sobre las recetas tradicionales, en donde un farmacéutico divide el suministro de un producto farmacéutico de un suministro a granel, ya que el paciente siempre tiene acceso al prospecto contenido en el paquete del paciente, que normalmente falta en las recetas de los pacientes. Se ha demostrado que la inclusión de un prospecto mejora el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico.

Las composiciones para la administración nasal incluyen ungüentos, cremas, aerosoles, parches, geles, gotas líquidas e inserciones (por ejemplo, inserciones intraoculares). Dichas composiciones se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos.

15 Los ejemplos de formulaciones para la administración rectal o intravaginal incluyen pesarios y supositorios que pueden, por ejemplo, formarse a partir de un material moldeable o céreo conformado que contiene el compuesto activo. Las soluciones del compuesto activo también se pueden usar para la administración rectal.

20 Las composiciones para la administración por inhalación pueden tomar la forma de composiciones en polvo inhalables o pulverizaciones líquidas o en polvo, y pueden administrarse en forma estándar utilizando dispositivos inhaladores de polvo o dispositivos dispensadores de aerosol. Tales dispositivos son bien conocidos. Para la administración por inhalación, las formulaciones en polvo comprenden típicamente el compuesto activo junto con un diluyente en polvo sólido inerte tal como la lactosa.

25 El complejo de unión a células cancerosas generalmente se presentará en forma de dosis unitaria y, como tal, típicamente contendrá suficiente compuesto para proporcionar un nivel deseado de actividad biológica. Por ejemplo, una formulación puede contener de 1 nanogramo a 2 gramos de ingrediente activo, p. ej. de 1 nanogramo a 2 miligramos de ingrediente activo. Dentro de estos intervalos, los subgrupos particulares de compuestos son de 0,1 miligramos a 2 gramos de ingrediente activo (más generalmente de 10 miligramos a 1 gramo, por ejemplo, de 50 miligramos a 500 miligramos), o de 1 microgramo a 20 miligramos (por ejemplo, de 1 microgramo a 10 miligramos). miligramos, por ejemplo de 0,1 miligramos a 2 miligramos de ingrediente activo).

30 El compuesto activo se administrará a un paciente que lo necesite (por ejemplo, un paciente humano o animal) en una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado.

Terapia anticáncer

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un complejo de unión a células cancerosas de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer. De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción, se proporciona el uso de un complejo de unión a células cancerosas como se define en el presente documento en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer.

De acuerdo con un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un individuo que lo necesite un complejo de unión a células como se define en el presente documento.

40 Los ejemplos de cánceres (y sus contrapartes benignas) que pueden tratarse (o inhibirse) incluyen, entre otros, tumores de origen epitelial (adenomas y carcinomas de diversos tipos, incluidos adenocarcinomas, carcinomas escamosos, carcinomas de células de transición y otros carcinomas) como carcinomas de vejiga y tracto urinario, mama, tracto gastrointestinal (incluido el esófago, estómago (gástrico), intestino delgado, colon, recto y ano), hígado (carcinoma hepatocelular), vesícula biliar y sistema biliar, páncreas exocrino, riñón, pulmón (por ejemplo, adenocarcinomas, carcinomas de pulmón de células pequeñas, carcinomas de pulmón de células no pequeñas, carcinomas bronquioalveolares y mesoteliomas), cabeza y cuello (por ejemplo, cáncer de lengua, cavidad bucal, laringe, faringe, nasofaringe, amígdalas, glándulas salivales, cavidad nasal y senos paranasales), ovario, trompas de Falopio, peritoneo, vagina, vulva, pene, cuello uterino, miometrio, endometrio, tiroides (por ejemplo, carcinoma folicular de tiroides), adrenal, próstata, piel y anexos (por ejemplo, melanoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, queratoacantoma, náuseas displásicas); neoplasias hematológicas (es decir, leucemias, linfomas) y trastornos hematológicos premalignos y enfermedades malignas límite, incluidas neoplasias hematológicas y afecciones relacionadas del linaje linfocítico (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda [ALL], leucemia linfocítica crónica [CLL], linfomas de células B como linfoma de células B grandes difusas [DLBCL], linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto, linfomas de células T y leucemias, linfomas de células asesinas naturales [NK], linfomas de Hodgkin, leucemia de células pilosas, gammapatía monoclonal de importancia incierta, plasmocitoma, mieloma múltiple y trastornos linfoproliferativos del trasplante) y neoplasias hematológicas y afecciones relacionadas con el linaje mieloide (por ejemplo, leucemia mielógena aguda [AML], leucemia mielógena crónica [CML], leucemia mielomonocítica crónica [CMML], síndrome hipereosinofílico, trastornos mieloproliferativos

tales como polipito epitelial, y mielofibrosis primaria, síndrome mieloproliferativo, síndrome de mielodisplasia y leucemia promielocítica); tumores de origen mesenquimatoso, por ejemplo, sarcomas de tejidos blandos, huesos o cartílagos como los osteosarcomas, fibrosarcomas, condrosarcomas, rhabdiosarcomas, leiomiomas, liposarcomas, angiosarcomas, sarcoma de Kaposi, sarcoma de Ewing, sarcoma sinovial, sarcomas sinoviales, sarcomas epitelioides, tumores estromales gastrointestinales, histiocitomas benignos y malignos, y dermatofibrosarcoma protuberans, tumores del sistema nervioso central o periférico (por ejemplo, astrocitomas, gliomas y glioblastomas, meningiomas, ependimomas, tumores pineales y schwannomas); tumores endocrinos (por ejemplo, tumores hipofisarios, tumores suprarrenales, tumores de células de los islotes, tumores paratiroides, tumores carcinoides y carcinoma medular de la tiroides); tumores oculares y anexos (por ejemplo, retinoblastoma); tumores de células germinales y trofoblásticos (por ejemplo, teratomas, seminomas, disgerminomas, lunares hidatiformes y coriocarcinomas); y tumores pediátricos y embrionarios (por ejemplo, meduloblastoma, neuroblastoma, tumor de Wilms y tumores neuroectodérmicos primitivos); o síndromes, congénitos o de otro tipo, que dejan al paciente susceptible a la malignidad (por ejemplo, Xeroderma Pigmentosum).

En una realización, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón y colorrectal.

Los complejos se administran generalmente a un sujeto que necesita tal administración, por ejemplo, un paciente humano o animal, preferiblemente un humano.

Los complejos de unión a células cancerosas se administrarán típicamente en cantidades que son terapéutica o profilácticamente útiles y que generalmente no son tóxicas. Sin embargo, en ciertas situaciones (por ejemplo, en el caso de enfermedades que amenazan la vida), los beneficios de administrar un complejo de unión a células cancerosas pueden superar las desventajas de cualquier efecto tóxico o efectos secundarios, en cuyo caso se puede considerar conveniente administrar complejos de unión a células cancerosas en cantidades que están asociadas con un grado de toxicidad.

Los complejos de unión a células cancerosas pueden administrarse durante un período prolongado para mantener efectos terapéuticos beneficiosos o pueden administrarse solo por un período corto. Alternativamente, pueden administrarse de una manera continua o de una manera que proporcione una dosificación intermitente (por ejemplo, una manera pulsátil).

Una dosis diaria típica del complejo de unión a células cancerosas puede estar en el intervalo de 100 picogramos a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal, más típicamente de 5 nanogramos a 25 miligramos por kilogramo de peso corporal, y más generalmente de 10 nanogramos a 15 miligramos por kilogramo (por ejemplo, de 10 nanogramos a 10 miligramos, y más generalmente de 1 microgramo por kilogramo a 20 miligramos por kilogramo, por ejemplo de 1 microgramo a 10 miligramos por kilogramo) por kilogramo de peso corporal, aunque se pueden administrar dosis más altas o más bajas cuando sea necesario. El complejo de unión a células cancerosas se puede administrar diariamente o de manera repetida cada 2, o 3, o 4, o 5, o 6, o 7, o 10 o 14, o 21, o 28 días, por ejemplo.

El complejo de unión a células cancerosas se puede administrar en un intervalo de dosis, por ejemplo, de 1 a 1500 mg, de 2 a 800 mg, o de 5 a 500 mg, por ej. de 2 a 200 mg o de 10 a 1000 mg, en particular ejemplos de dosis que incluyen 10, 20, 50 y 80 mg. El complejo de unión a células cancerosas se puede administrar una o más veces al día. El complejo de unión a células cancerosas se puede administrar de forma continua (es decir, se toma todos los días sin interrupción durante la duración del régimen de tratamiento). Alternativamente, el complejo de unión a células cancerosas se puede administrar de manera intermitente (es decir, se toma de forma continua durante un período determinado, como una semana, luego se suspende durante un período de una semana y luego se toma de manera continua durante otro período de una semana y así sucesivamente durante toda la duración del régimen de tratamiento). Los ejemplos de regímenes de tratamiento que incluyen la administración intermitente incluyen regímenes en los que la administración se realiza en ciclos de una semana, una semana de descanso; o dos semanas después, una semana libre; o tres semanas después, una semana libre; o dos semanas después, dos semanas libres; o cuatro semanas en dos semanas de descanso; o una semana en tres semanas de descanso, por uno o más ciclos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más ciclos.

En un programa de dosificación particular, a un paciente se le administrará una infusión de un complejo de unión a células cancerosas durante períodos de una hora al día durante hasta diez días, en particular hasta cinco días durante una semana, y el tratamiento se repetirá en un intervalo deseado, como de dos a cuatro semanas, en particular cada tres semanas.

Más particularmente, a un paciente se le puede administrar una infusión de un compuesto de fórmula (I) durante períodos de una hora diaria durante 5 días y el tratamiento se repite cada tres semanas.

En otro programa de dosificación particular, a un paciente se le administra una infusión de 30 minutos a 1 hora, seguido de infusiones de mantenimiento de duración variable, por ejemplo de 1 a 5 horas, por ejemplo 3 horas.

En un programa de dosificación particular adicional, a un paciente se le da una infusión continua durante un período de 12 horas a 5 días, y en particular una infusión continua de 24 horas a 72 horas.

En última instancia, sin embargo, la cantidad de complejo de unión a células cancerosas administrada y el tipo de composición utilizada serán proporcionales a la naturaleza de la enfermedad o afección fisiológica que se está tratando y será a criterio del médico.

5 Se apreciará que los complejos de unión a células cancerosas se pueden usar como un agente único o en combinación con otros agentes anticancerígenos. Los experimentos de combinación se pueden realizar, por ejemplo, como se describe en Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regulat* 1984; 22: 27-55.

10 Los ejemplos de otros agentes terapéuticos o tratamientos que pueden administrarse juntos (ya sea concurrentemente o en diferentes intervalos de tiempo) con los complejos de unión de células cancerosas incluyen, entre otros:

- Inhibidores de la topoisomerasa I;
- Antimetabolitos;
- Agentes dirigidos a la tubulina;
- Aglutinante de ADN e inhibidores de la topoisomerasa II;

15 • Agentes alquilantes;

- Anticuerpos monoclonales;
- Anti-hormonas;
- Inhibidores de la transducción de señales;
- Inhibidores del proteasoma;

20 • ADN metil transferasas;

- Citoquinas y retinoides;
- Terapias dirigidas a la cromatina;
- Radioterapia; y
- Otros agentes terapéuticos o profilácticos.

25 Cuando el complejo de unión a células cancerosas se administra en terapia de combinación con uno, dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos diferentes (preferiblemente uno o dos, más preferiblemente uno), los agentes pueden administrarse simultánea o secuencialmente. En este último caso, los dos o más agentes se administrarán dentro de un período y en una cantidad y manera suficientes para asegurar que se logre un efecto ventajoso o sinérgico. Cuando son administrados secuencialmente, pueden administrarse a intervalos muy espaciados (por ejemplo, durante un período de 5 a 10 minutos) o a intervalos más largos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más horas de diferencia, o incluso períodos más largos de separación cuando sea necesario), siendo el régimen de dosificación preciso acorde con las propiedades del(de los) agente(s) terapéutico(s). Estas dosis se pueden administrar, por ejemplo, una vez, dos veces o más por curso de tratamiento, que se puede repetir, por ejemplo, cada 7, 14, 21 ó 28 días.

35 Se apreciará que el método preferido y el orden de administración y las cantidades y regímenes de dosificación respectivos para cada componente de la combinación dependerán de la administración del otro agente medicinal particular y del complejo de unión de células cancerosas de la presente invención, su ruta de administración, el tumor particular que se está tratando y el huésped particular que se está tratando. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente el método y el orden de administración óptimos, y las cantidades y el régimen de la dosis, utilizando métodos convencionales y teniendo en cuenta la información que se detalla en el presente documento.

40 La relación en peso del complejo de unión a células cancerosas de acuerdo con la presente invención y el uno o más agentes anticancerosos cuando se administran como una combinación puede ser determinada por el experto en la materia. Dicha proporción y la dosis exacta y la frecuencia de administración dependen del complejo de unión de células cancerosas en particular de acuerdo con la invención y del otro agente(s) contra el cáncer usado, la condición particular que se está tratando, la gravedad de la condición que se está tratando, la edad, el peso, sexo, dieta, tiempo de administración y estado físico general del paciente en particular, el modo de administración así como otros medicamentos que el individuo puede estar tomando, como es bien conocido por los expertos en la materia. Además, es evidente que la cantidad diaria eficaz puede disminuirse o aumentarse dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescribe los complejos de unión de células cancerosas de la presente invención. Una relación de peso particular para el presente complejo de unión de

células cancerosas y otro agente anticancerígeno puede variar de 1/10 a 10/1, más en particular de 1/5 a 5/1, aún más en particular de 1/3 a 3/1.

Los complejos de unión a células cancerosas de la invención también pueden administrarse junto con tratamientos no quimioterapéuticos tales como radioterapia, terapia fotodinámica, terapia génica; cirugía y dietas controladas.

5 Para su uso en terapia de combinación con otro agente quimioterapéutico, el complejo de unión de células cancerosas y uno, dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos pueden, por ejemplo, formularse juntos en una forma de dosificación que contenga dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos. Es decir, en una composición farmacéutica unitaria que contenga todos los componentes. En una realización alternativa, los agentes terapéuticos individuales pueden formularse por separado y presentarse juntos en forma de un kit, opcionalmente con instrucciones para su uso.

Los siguientes estudios ilustran la utilidad de los aptámeros descritos:

Ejemplo 1: Análisis de unión a la proteína recombinante de EGFR utilizando resonancia de plasmón de superficie (SPR)

15 La unión del aptámero a la proteína recombinante EGFR se evaluó mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR). Los experimentos de SPR se realizaron en un sistema 404pi (BioOptix, Boulder, CO), a una temperatura constante de 20°C, 20 $\mu\text{l min}^{-1}$ de caudal, utilizando un tampón de funcionamiento (1 PBS desgasificado, MgCl_2 5 mM, Tween al 0,05%) para todos los pasos de acoplamiento y captura. N-hidroxisuccinimida (NHS) 0,1 M en MOPS, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,4 M, clorhidrato de etanolamina 1 M (pH 8,5) y acetato de sodio 10 mM, pH 4,5, eran de Sigma (St. Louis, MO). EGFR se obtuvo de R&D Systems (Minneapolis, MN). Tres placas de 96 pocillos de oligonucleótidos se sintetizaron mediante química de fosforamida en fase sólida por Boston Open Labs (Cambridge, MA) con una biotina 5'. La superficie en los cuatro canales de un chip sensor CDM150 (BioOptix) se activó mediante la inyección de 140 μl de una mezcla 1:1 (v/v) de EDC y NHS. Luego, se inyectaron 350 μl de EGFR 285 nM en acetato de sodio 10 mM, pH 4,5, en los 4 canales y se unieron covalentemente a una densidad de ~8000 unidades de respuesta (RU) durante 1050 segundos. Finalmente, la superficie se bloqueó con una inyección de 200 μl de clorhidrato de etanolamina 1 M.

25 Las cinéticas de unión del aptámero se midieron mediante inyección sobre el chip funcionalizado. Los aptámeros se diluyeron a una concentración entre 50 y 250 nM, y cada uno se examinó en una inyección de 100 μl , seguido de una fase de disociación de 400 segundos. En lugar de un canal de referencia, las inyecciones tampón se utilizaron entre 2 y 3 conjuntos de aptámeros para la sustracción de la señal de fondo. Los datos se procesaron y analizaron utilizando un Scrubber (BioLogic Software, Campbell, Australia).

35 Alternativamente, se utilizó un Octet Red 96 (ForteBio, Menlo Park, CA) para los conjuntos de aptámeros que comienzan con ALT102134.01. El tampón de muestra que contenía DPBS (sin Mg, sin Ca) fue suplementado con MgC 5 mM y Tween-20 al 0,05% y fue utilizado para las diluciones, la línea de base y los pasos de disociación. Para estos ensayos, los pines de estreptavidina se funcionalizaron con soluciones de aptámero biotinilado 100 nM durante 400 segundos. La asociación se midió con EGFR 50 nM en un tampón de muestra durante 400 segundos. La disociación se midió en tampón de muestra. Los datos se procesaron y analizaron utilizando el software de análisis de datos ForteBio.

40 Los resultados del análisis de SPR se muestran en las Figuras 1 a 15 en las que se puede ver que la mayoría de los aptámeros probados demostraron un buen nivel de unión a la proteína EGFR recombinante. En ciertos análisis, el aptámero conocido (MinE07) también se probó como control y se puede observar que la mayoría de los aptámeros de la invención demostraron una unión equivalente o mejor a la proteína recombinante EGFR que el MinE07.

Ejemplo 2: Análisis de unión a células EGFR utilizando citometría de flujo

45 La unión del aptámero a las células que expresaban EGFR se evaluó mediante citometría de flujo (FCM). Antes del ensayo, los aptámeros biotinilados se equilibraron térmicamente a 65°C durante 5 minutos, seguido de enfriamiento a 0,1°C/s a temperatura ambiente. Las células adherentes se disociaron de los matraces utilizando un tampón de disociación celular no enzimático (NECDB; Gibco, Carlsbad CA) y se lavaron con DPBS (sin Mg y sin Ca; Sigma).

50 En un ensayo típico, las placas de cultivo celular de 12 pocillos se inocularon con células (A431, LN-18 o MDA-MB-435) y se cultivaron hasta un ~90% de confluencia durante 1-2 días. Los medios de cultivo se eliminaron y las células se lavaron dos veces con al menos 1 ml de tampón de unión, luego se bloquearon en 250 μl de tampón de unión (DPBS que contenía 0,1 mg/ml de ARNt) suplementado con 1 mg/ml de BSA durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y las células se incubaron en un tampón de unión con 50 ó 100 nM de aptámero sintetizado agitado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron tres veces con 500 μl de tampón de lavado (DPBS que contenía 0,1 mg/ml de ARNt). Las células se tiñeron en 250 μl de tampón complementado con 0,5 μl de estreptavidina PE-Cy 5.5 (SA-PE-Cy) o estreptavidina-Alexafluor 488 (SA-AF) (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces en 500 μl de tampón de lavado y luego se disociaron de las placas de cultivo con 250 μl de NECDB. Las células libres se transfirieron a tubos falcon de fondo redondo de 5 ml (BD Biosciences, San Jose,

CA) y las placas se lavaron con 750 µl de DPBS modificado (con Mg y Ca; Sigma). Las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron con 300 µl de tampón de lavado. Las células se analizaron mediante citometría de flujo en un FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA).

5 Los resultados del análisis de citometría de flujo se muestran en las Figuras 16 a 19, en donde se puede ver que todos los aptámeros probados demostraron un buen nivel de unión a los tipos de células EGFR A431, LN-18 y/o A549 (la traza sombreada a la izquierda en cada figura representa la traza observada en ausencia de aptámero). El aptámero conocido (MinE07) también se probó como control y se puede ver que todos los aptámeros probados demostraron una unión equivalente a las células EGFR. Además, puede verse que ciertos aptámeros (es decir, ALT102054.01, ALT102135.01, ALT102139.01 y ALT102145.01) se unen a más de un tipo de célula EGFR (es decir, A431 y A549 para ALT102054.01 y LN-18 y A549 para ALT102135.01, ALT102139.01 y ALT102145.01).

Ejemplo 3: Análisis de estabilidad usando un ensayo de degradación en suero

15 La degradación del aptámero por nucleasas séricas se evaluó comparando la intensidad de fragmentos separados por agarosa de aptámeros en incubaciones de suero (SDA). Los aptámeros se sintetizaron químicamente con una biotina 5' y una dT (idT) invertida 3' por los laboratorios Boston Open. Tras el equilibrio térmico, se incubaron 7,5 µM de aptámero en suero de rata Sprague Dawley al 70% (Innovative Research; Novi, MI) de 0 a 36 horas y se separaron 10 uL en un E-gel selecto de tamaño del 2% (Invitrogen). Se tomaron imágenes del gel mediante excitación UV y se cuantificaron las bandas con ImageJ. La intensidad se restó del fondo y se comparó con el punto de tiempo 0.

20 Los resultados del análisis de citometría de flujo se muestran en las Figuras 20 a 22, donde la Figura 20 presenta el gel con imágenes, la Figura 21 presenta un gráfico en el que el fondo se ha sustraído de la señal y la Figura 22 presenta un gráfico en % de señal en el punto de tiempo de 0 horas con el fondo restado de la señal. Se puede ver en los resultados de estas Figuras que ambos aptámeros probados demostraron un nivel superior de resistencia contra la degradación cuando se compararon con el aptámero conocido modificado correspondiente (MinE07 idT). El aptámero ALT102138 también pareció demostrar un mayor nivel de resistencia contra la degradación en comparación con ALT102136.

Listado de secuencias

- <110> Altermune Technologies, LLC
- 30 <120> Aptámeros contra EGFR y sus usos terapéuticos
- <130> ATM-C-P1748PCT
- <150> GB1411150.4
- 35 <151> 2014-06-23
- <160> 84
- <170> PatentIn versión 3.5
- 40 <210> 1
- <211> 48
- <212> RNA
- <213> Artificial
- 45 <220>
- <223> Aptámero sintético
- <220>
- <221> característica miscelánea
- 50 <222> (1)..(2)
- <223> ausente o G
- <220>
- <221> característica miscelánea
- 55 <222> (3)..(3)
- <223> ausente o A
- <220>
- <221> característica miscelánea
- 60 <222> (4)..(4)
- <223> ausente o C

- 5 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (5)..(6)
<223> ausente o G
- 10 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (7) .. (7)
<223> ausente o A
- 15 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (8)..(9)
<223> ausente o U
- 20 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (45)..(45)
<223> ausente o G
- 25 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (46) .. (46)
<223> ausente o U
- 30 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (47)..(47)
<223> ausente o C
- <400> 1
nnnnnnnnnu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccnnc 48
- 35 <210> 2
<211> 48
<212> RNA
<213> Artificial
- 40 <220>
<223> Aptámero sintético
- 45 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)..(2)
<223> ausente o G
- 50 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (3)..(3)
<223> ausente o A
- 55 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (4) .. (4)
<223> ausente o fC
- 60 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (5)..(6)
<223> ausente o G
- 65 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (7)..(7)
<223> ausente o A

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (8)..(9)
 5 <223> ausente o fU

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (45)..(45)
 10 <223> ausente o G

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (46) .. (46)
 15 <223> ausente o fU

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (47)..(47)
 20 <223> ausente o fC

<400> 2
 nnnnnnnnu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccnnc 48

25 <210> 3
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Aptámero sintético

<400> 3
 35 cggauuuuau cgccguagaa aagcauguca aagccggaac cgucc 45

<210> 4
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Aptámero sintético

<400> 4
 45 ggauuuuau cgccguagaa aagcauguca aagccggaac cgucc 45

<210> 5
 <211> 42
 <212> RNA
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero sintético

55 <400> 5
 auuuauucgc cguagaaaag caugucaaag ccggaaccgu cc 42

<210> 6
 <211> 42
 60 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aptámero sintético

65 <400> 6

ES 2 724 354 T3

5 gggauuuau cgccguagaa aagcauguca aagccggaac cc 42
 <210> 7
 <211> 39
 <212> RNA
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Aptámero sintético

 <400> 7
 uaaucgccgu agaaaagcau gucaaagccg gaaccgucc 39

 15 <210> 8
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Aptámero sintético

 <400> 8
 ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc 48

 25 <210> 9
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> Aptámero sintético

 <400> 9
 ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc 48

 35 <210> 10
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Aptámero sintético

 <400> 10
 ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc 48

 45 <210> 11
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Aptámero sintético

 <400> 11
 ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc 48

 55 <210> 12
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial

 60 <220>
 <223> Aptámero sintético

 65 <400> 12

ES 2 724 354 T3

	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 13	
	<211> 48	
5	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Aptámero sintético	
	<400> 13	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 14	
15	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Aptámero sintético	
	<400> 14	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
25	<210> 15	
	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
	<400> 15	
35	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 16	
	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
	<400> 16	
45	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 17	
	<211> 48	
	<212> RNA	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
	<400> 17	
55	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 18	
	<211> 48	
60	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
65	<400> 18	

ES 2 724 354 T3

	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
5	<210> 19 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
10	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 19 ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
15	<210> 20 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
20	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 20 ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
25	<210> 21 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
30	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 21 ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
35	<210> 22 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
40	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 22 ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
45	<210> 23 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
50	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 23 ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
55	<210> 24 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
60	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 24	
65		

ES 2 724 354 T3

	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
5	<210> 25 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
10	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 25	48
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	
15	<210> 26 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
20	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 26	48
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	
25	<210> 27 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
30	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 27	48
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	
35	<210> 28 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
40	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 28	48
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	
50	<210> 29 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
55	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 29	48
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	
60	<210> 30 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
65	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 30	

ES 2 724 354 T3

	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
5	<210> 31 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
10	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 31	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
15	<210> 32 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
20	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 32	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
25	<210> 33 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
30	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 33	
35	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
40	<210> 34 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
45	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 34	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
50	<210> 35 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
55	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 35	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
60	<210> 36 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
65	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 36	

ES 2 724 354 T3

	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
5	<210> 37 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
10	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 37	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
15	<210> 38 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
20	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 38	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
25	<210> 39 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
30	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 39	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
35	<210> 40 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
40	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 40	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
45	<210> 41 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
50	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 41	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
55	<210> 42 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
60	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 42	
65	<210> 42 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
70	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 42	

ES 2 724 354 T3

	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
5	<210> 43 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
10	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 43	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
15	<210> 44 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
20	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 44	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
25	<210> 45 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
30	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 45	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
35	<210> 46 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
40	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 46	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
50	<210> 47 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
55	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 47	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
60	<210> 48 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
65	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 48	

ES 2 724 354 T3

	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 49	
	<211> 48	
5	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Aptámero sintético	
	<400> 49	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 50	
15	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Aptámero sintético	
	<400> 50	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
25	<210> 51	
	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
	<400> 51	
35	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 52	
	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
	<400> 52	
45	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 53	
	<211> 48	
	<212> RNA	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
55	<400> 53	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 54	
	<211> 48	
60	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
65	<400> 54	

ES 2 724 354 T3

	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
5	<210> 55 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
10	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 55	48
15	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc <210> 56 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
20	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 56	48
25	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc <210> 57 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
30	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 57	48
35	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc <210> 58 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
40	<220> <223> Aptámero sintético	
45	<400> 58 ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
50	<210> 59 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> Aptámero sintético	
55	<400> 59 ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
60	<210> 60 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
65	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 60	

ES 2 724 354 T3

	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 61	
	<211> 48	
5	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Aptámero sintético	
	<400> 61	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 62	
15	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Aptámero sintético	
	<400> 62	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
25	<210> 63	
	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
	<400> 63	
35	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 64	
	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
	<400> 64	
45	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 65	
	<211> 48	
	<212> RNA	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
55	<400> 65	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 66	
	<211> 48	
60	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
65	<400> 66	

ES 2 724 354 T3

	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
5	<210> 67 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
10	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 67	48
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	
15	<210> 68 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
20	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 68	48
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	
25	<210> 69 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
30	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 69	48
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	
35	<210> 70 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
40	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 70	48
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	
45	<210> 71 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
50	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 71	48
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	
55	<210> 72 <211> 48 <212> RNA <213> Artificial	
60	<220> <223> Aptámero sintético	
	<400> 72	
65		

ES 2 724 354 T3

	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 73	
	<211> 48	
5	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Aptámero sintético	
	<400> 73	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 74	
15	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Aptámero sintético	
	<400> 74	
	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
25	<210> 75	
	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
	<400> 75	
35	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 76	
	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
	<400> 76	
45	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 77	
	<211> 48	
	<212> RNA	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
	<400> 77	
55	ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc	48
	<210> 78	
	<211> 48	
60	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero sintético	
65	<400> 78	

ggacggauuu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aaccgucc 48

5 <210> 79
 <211> 42
 <212> RNA
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Aptámero sintético

<400> 79
 gggauuuaau cgccguagaa aagcauguca aagccggaac cc 42

15 <210> 80
 <211> 42
 <212> RNA
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Aptámero sintético

<400> 80
 gggauuuaau cgccguagaa aagcauguca aagccggaac cc 42

25 <210> 81
 <211> 51
 <212> RNA
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Aptámero sintético

35 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (4)..(5)
 <223> ausente o G

40 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6) .. (6)
 <223> ausente o A

45 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(7)
 <223> ausente o C

50 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (8)..(9)
 <223> ausente o G

55 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (10)..(10)
 <223> ausente o A

60 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (11)..(12)
 <223> ausente o U

65 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (48)..(48)
 <223> ausente o G

- 5 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (49) .. (49)
 <223> ausente o U
- 10 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (50)..(50)
 <223> ausente o C
- 15 <400> 81
 aaannnnnnn nnuaaucgcc guagaaaagc augucaaagc cggaaccnnc 51
- 15 <210> 82
 <211> 52
 <212> RNA
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> Aptámero sintético
- 25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (5)..(6)
 <223> ausente o G
- 30 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7) .. (7)
 <223> ausente o A
- 35 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (8)..(8)
 <223> ausente o C
- 40 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (9)..(10)
 <223> ausente o G
- 45 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (11)..(11)
 <223> ausente o A
- 50 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (12)..(13)
 <223> ausente o U
- 55 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (49) .. (49)
 <223> ausente o G
- 60 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (50)..(50)
 <223> ausente o U
- 65 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (51)..(51)
 <223> ausente o C

ES 2 724 354 T3

<400> 82
aaagnnnnnn nnnuaaucgc cguagaaaag caugucaaag ccggaaccnn nc 52

5 <210> 83
<211> 51
<212> RNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> Aptámero sintético

<400> 83
aaaggacgga uuuuauccgc guagaaaagc augucaaagc cggaaccguc c 51

15 <210> 84
<211> 45
<212> RNA
<213> Artificial

20 <220>
<223> Aptámero sintético

<400> 84
aaagggaauu aaucgccgua gaaaagcaug ucaaagccgg aacc 45

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido ribonucleico que comprende la secuencia de nucleótidos 5'-mGmG mG mAfUfU fUAA fUfCmG fCfCmG fUmAmG AmAmA AmGfC mAfUmG fUfCmA AAmG fCfCmG mGmAA fCfCfC-3' (ALT102139.01) (SEQ ID NO: 79), en donde "m" representa un nucleótido sustituido con 2'-O-metilo y "f" representa un nucleótido sustituido con 2'-fluoro.
2. La molécula de ácido ribonucleico como se define en la reivindicación 1, que adicionalmente comprende una modificación de terminación 3', tal como la adición de un nucleótido de timidina invertida (i-dT) en el extremo 3' de dicha molécula de ácido ribonucleico.
- 10 3. La molécula de ácido ribonucleico como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que adicionalmente comprende un motivo de nucleótido AAA o AAAG en el extremo 5'.
4. La molécula de ácido ribonucleico como se define en la reivindicación 3, en donde todos dichos nucleótidos adicionales contienen una sustitución 2'-OMe y dicha molécula tiene la secuencia de: 5'-mAmAmAmG mGmG mAfUfU fUAA fUfCmG fCfCmG fUmAmG AmAmA AmGfC mAfUmG fUfCmA AAmG fCfCmG mGmAA fCfCfC-3' (ALT102146.01) (SEQ ID NO: 84).
- 15 5. Un complejo de unión a células cancerosas que comprende una molécula de ácido ribonucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 conjugada con una molécula inmunogénica.
- 20 6. El complejo de unión a células cancerosas como se define en la reivindicación 5, en el que la molécula inmunogénica se selecciona de: el epítipo alfa-Gal (es decir, galactosil-alfa-1,3-galactosil-beta-1,4-N-acetilglucosamina), dinitrofenilo (DNP) y L-ramnosa, como el epítipo alfa-Gal (es decir, galactosil-alfa-1,3-galactosil-beta-1,4-N-acetilglucosamina).
7. Una composición farmacéutica que comprende al menos un complejo de unión a células cancerosas como se define en la reivindicación 5 o la reivindicación 6, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros agentes terapéuticos o profilácticos.
- 25 8. Un complejo de unión a células cancerosas como se define en la reivindicación 5 o la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento del cáncer.

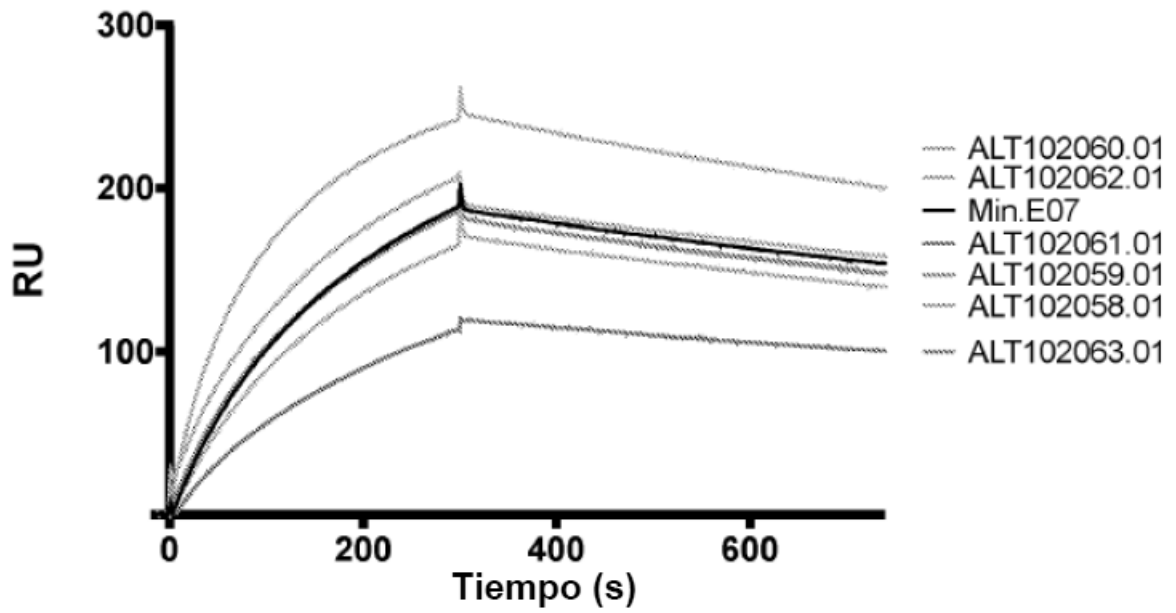


FIGURA 1

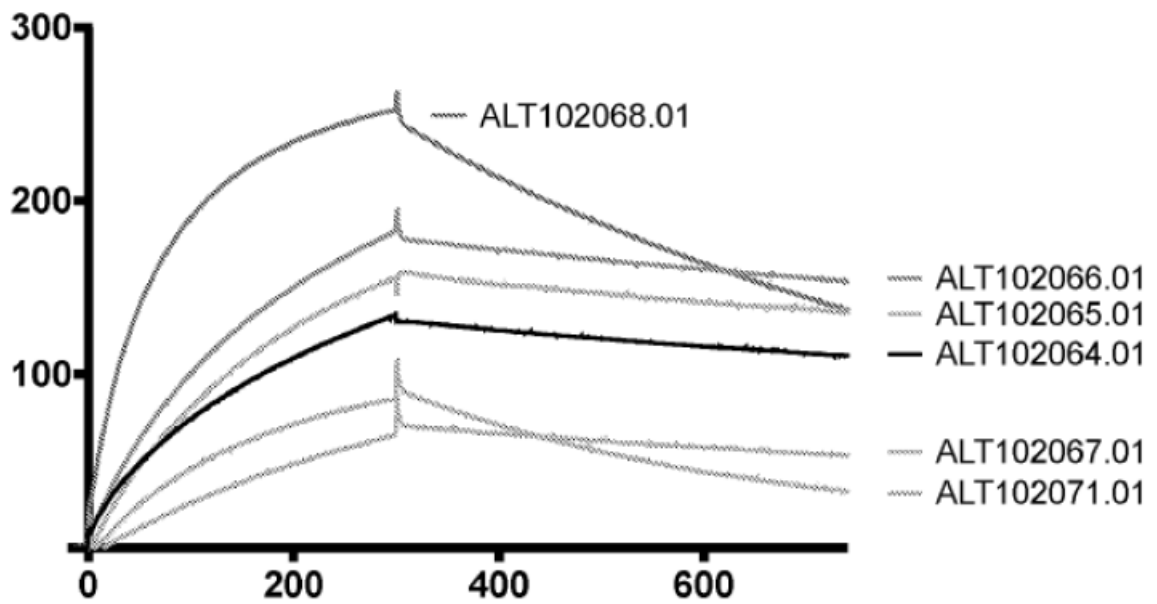


FIGURA 2

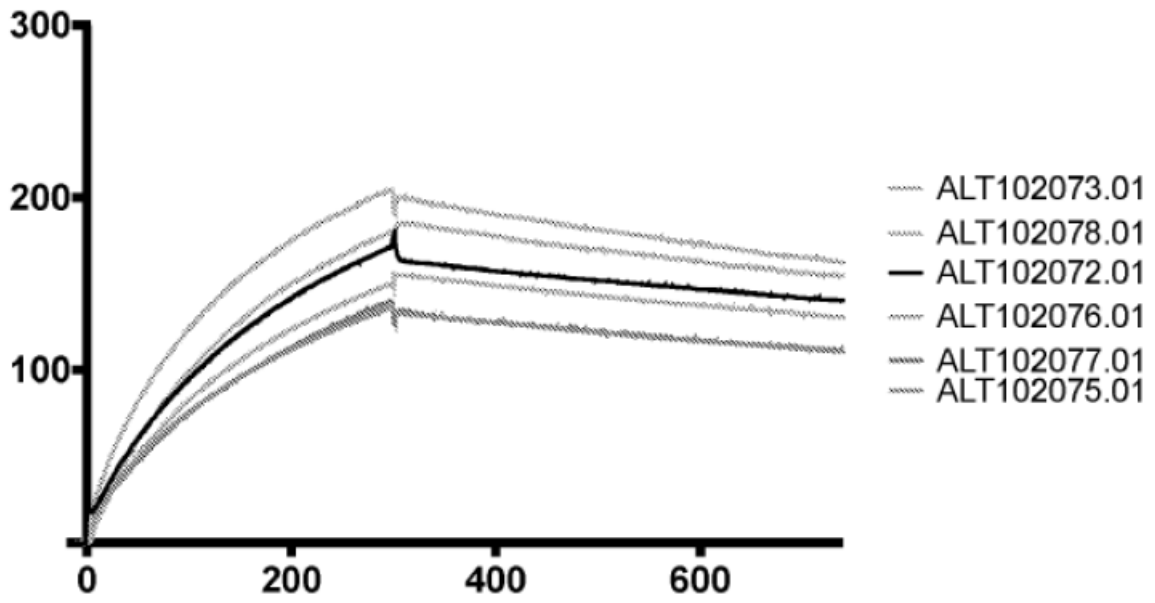


FIGURA 3

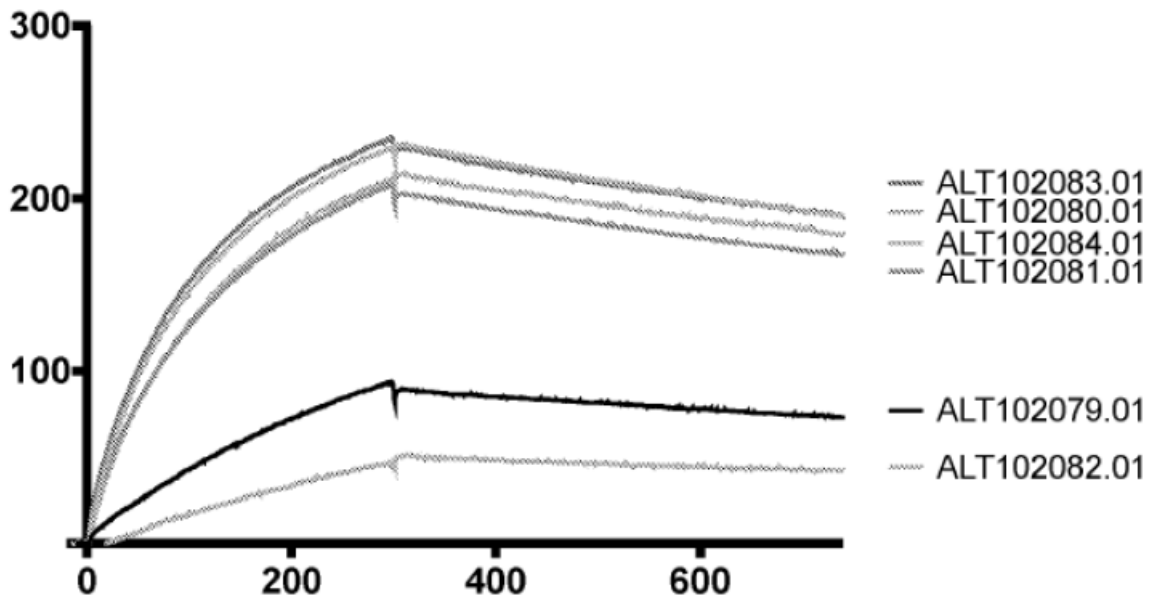


FIGURA 4

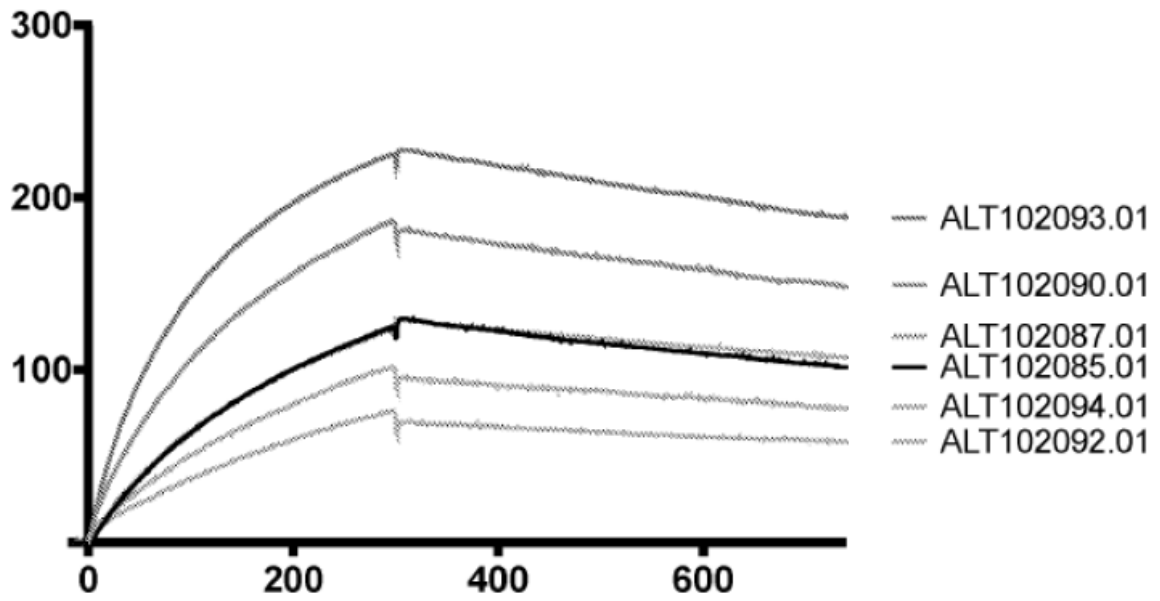


FIGURA 5

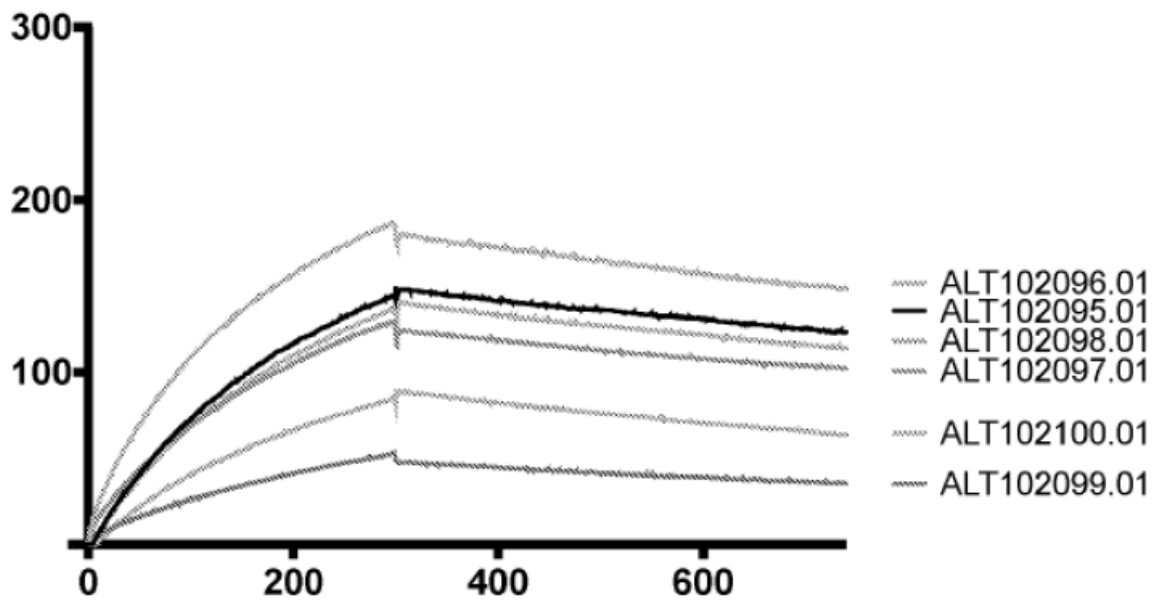


FIGURA 6

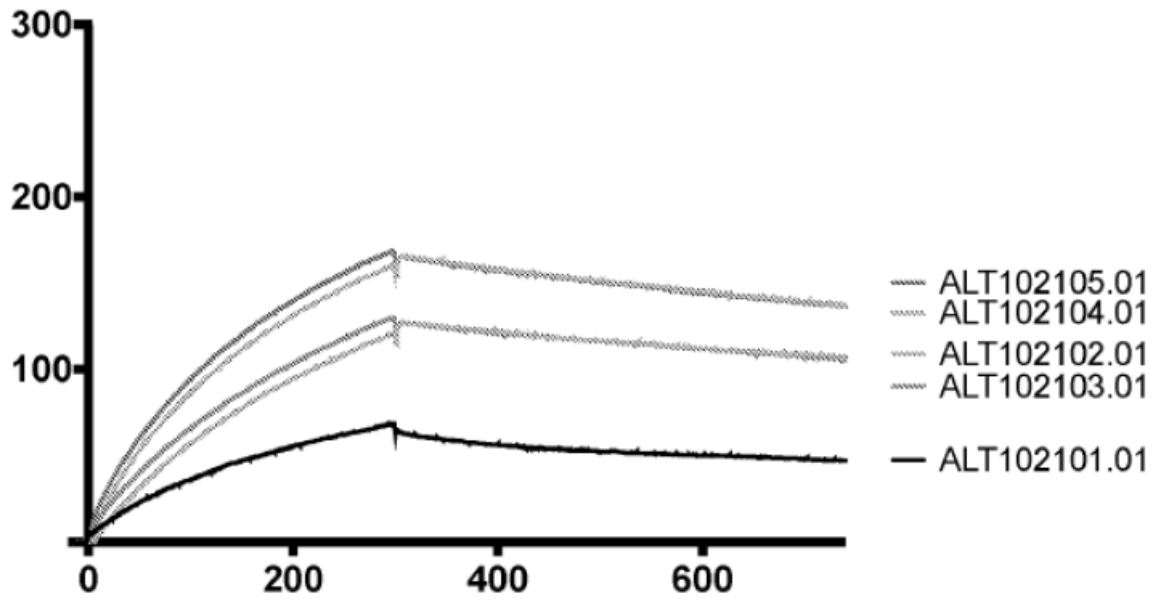


FIGURA 7

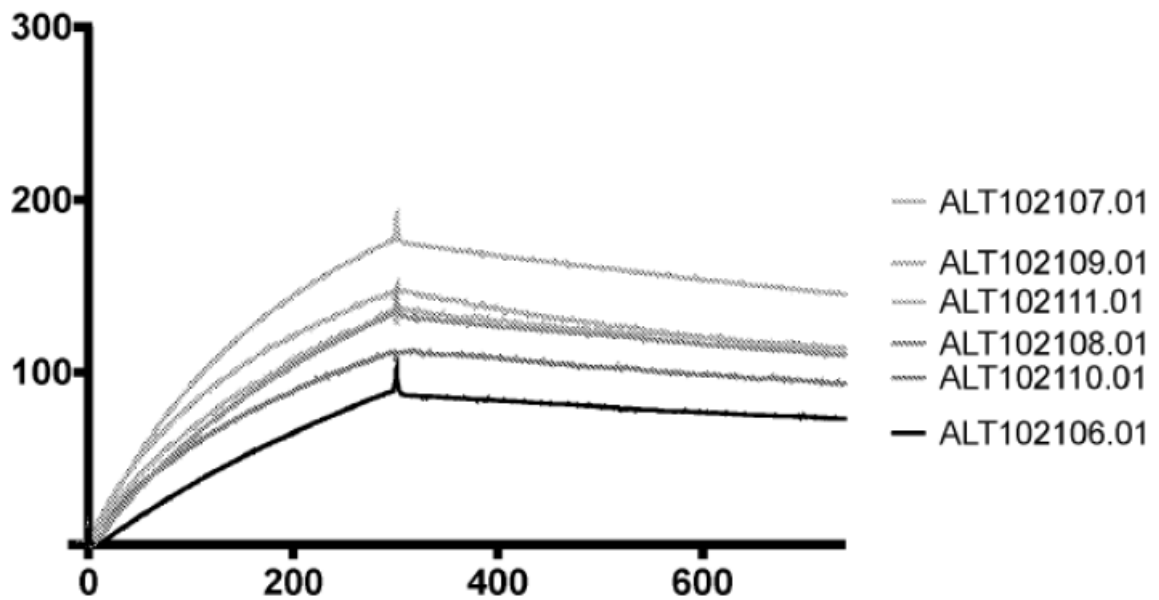


FIGURA 8

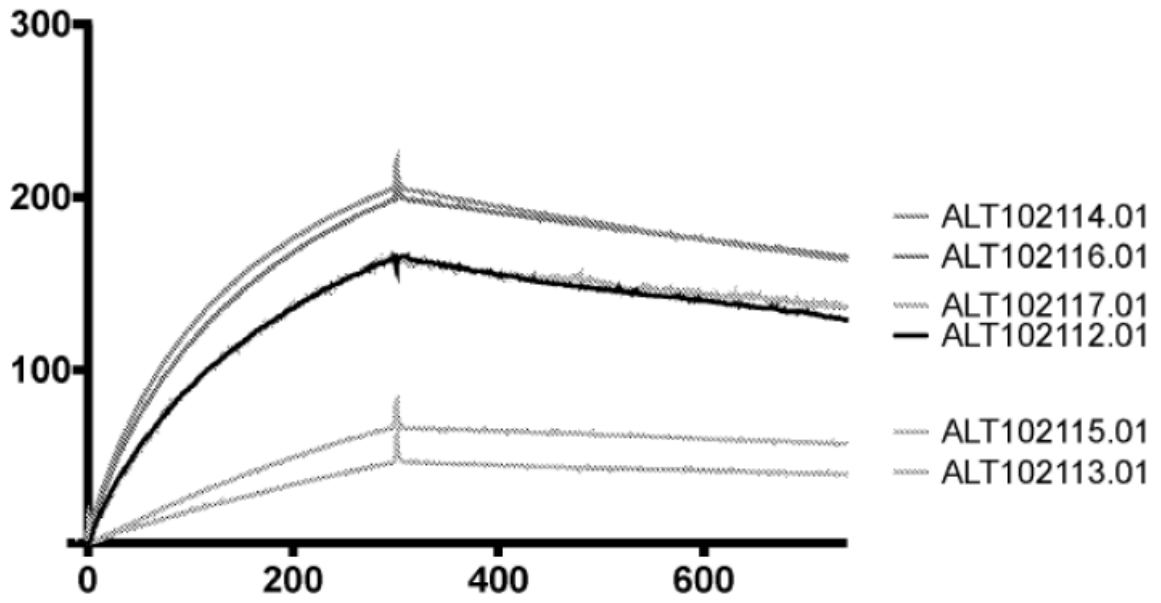


FIGURA 9

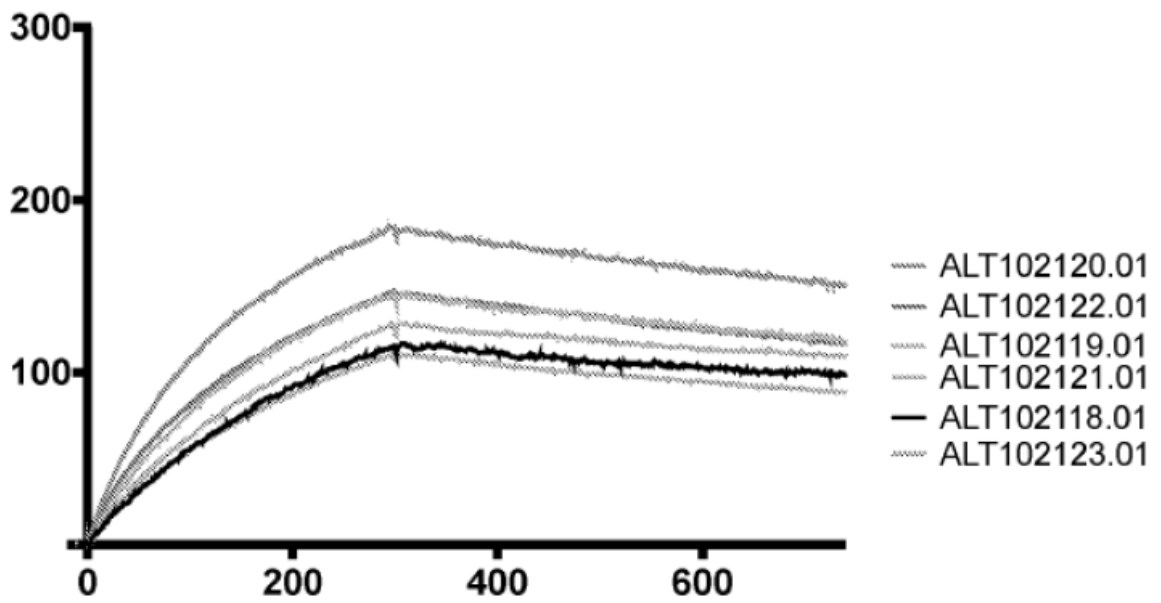


FIGURA 10

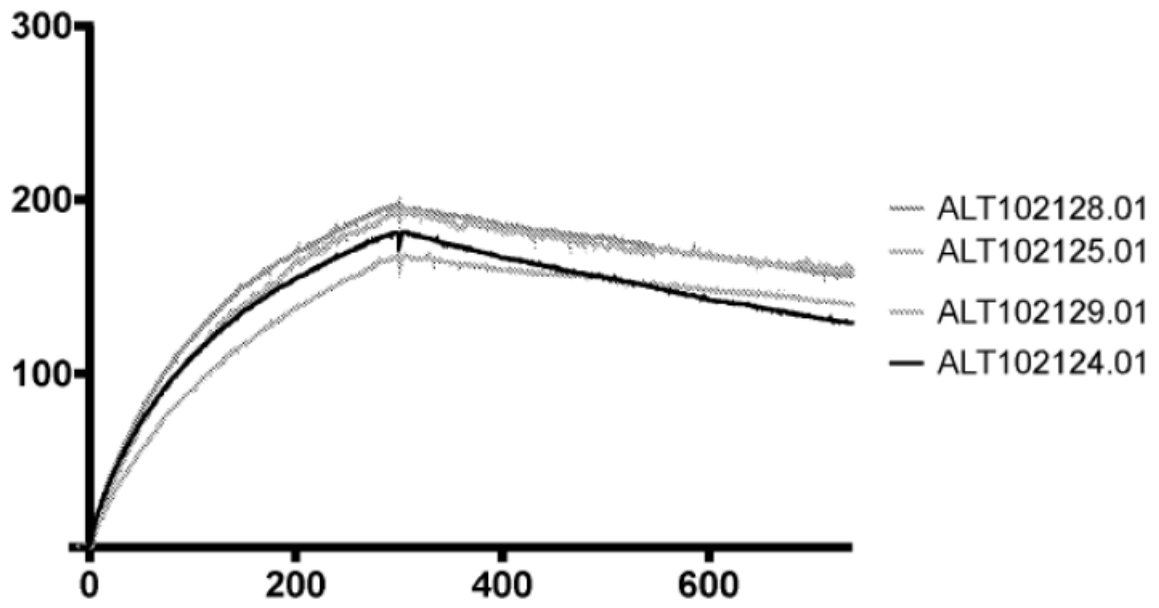


FIGURA 11

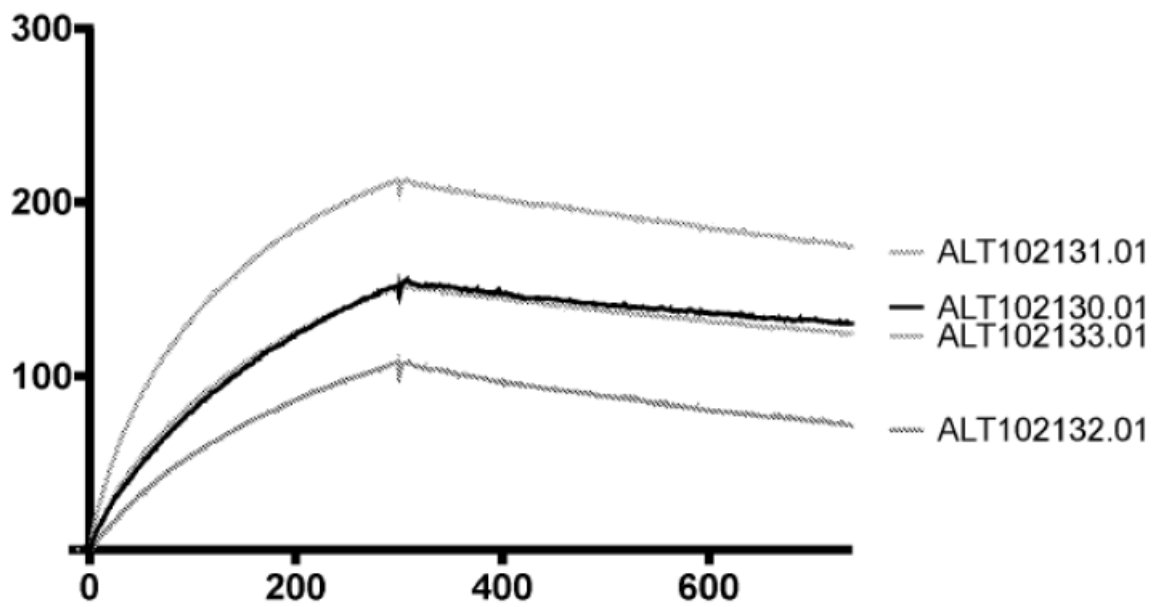


FIGURA 12

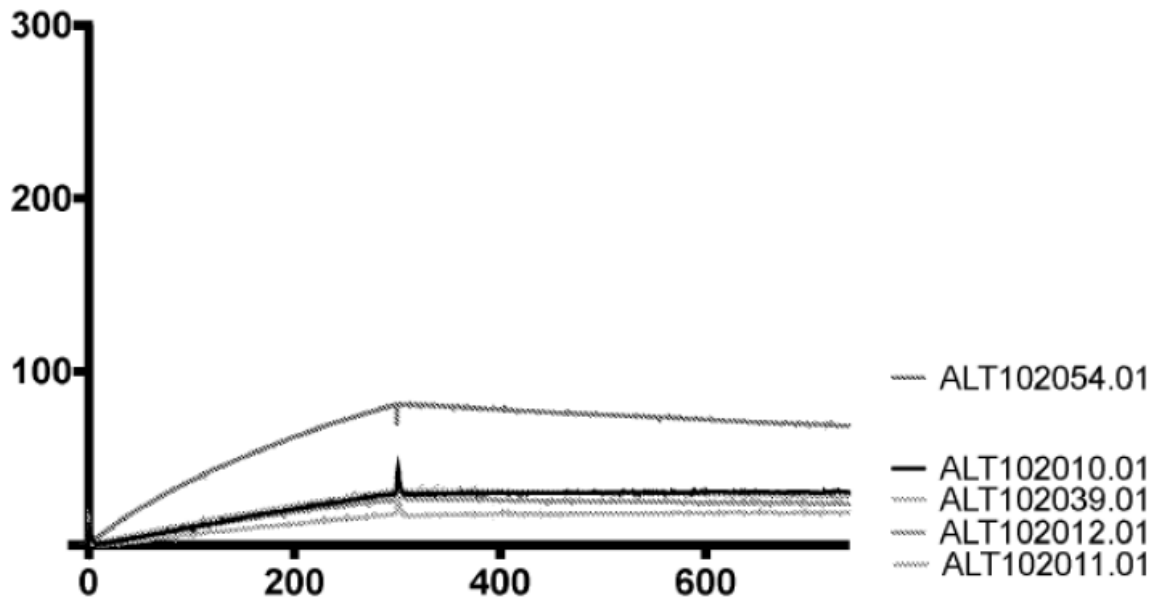


FIGURA 13

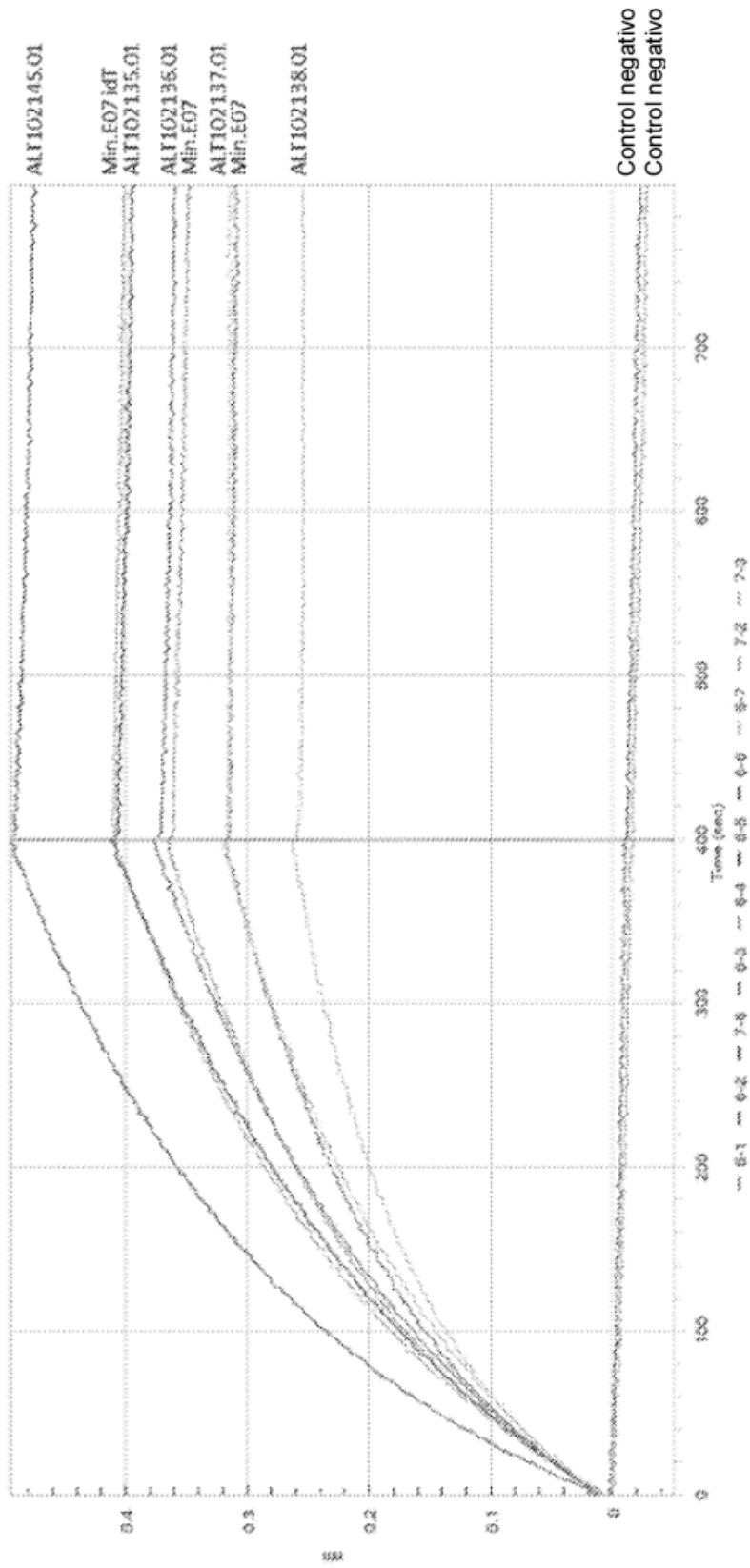


FIGURA 14

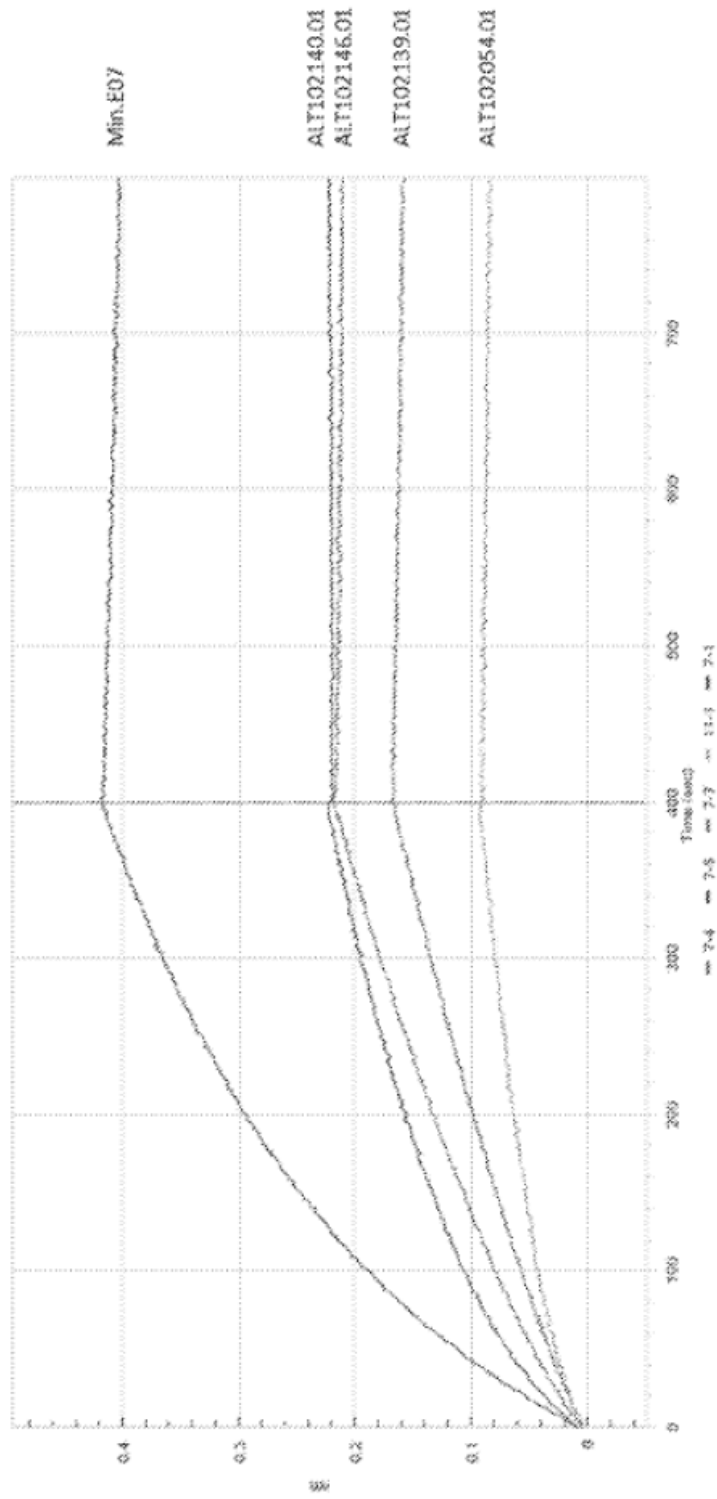


FIGURA 15

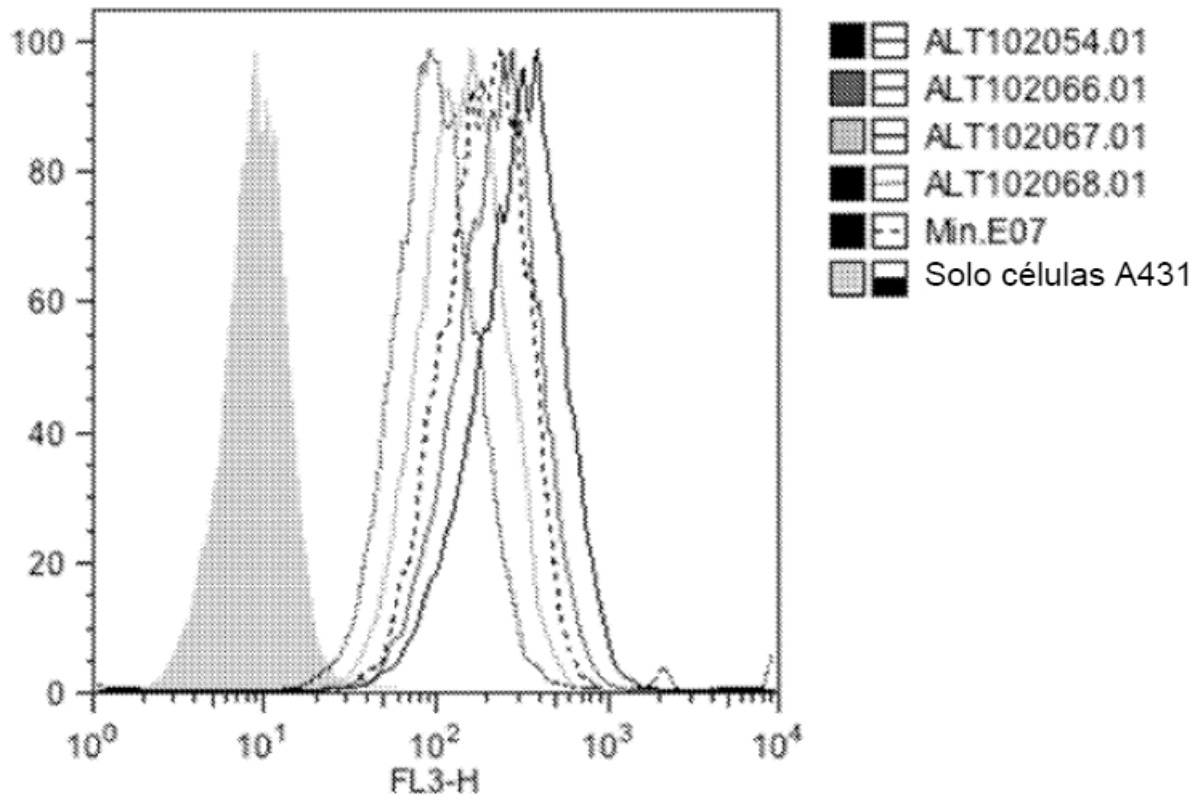


FIGURA 16

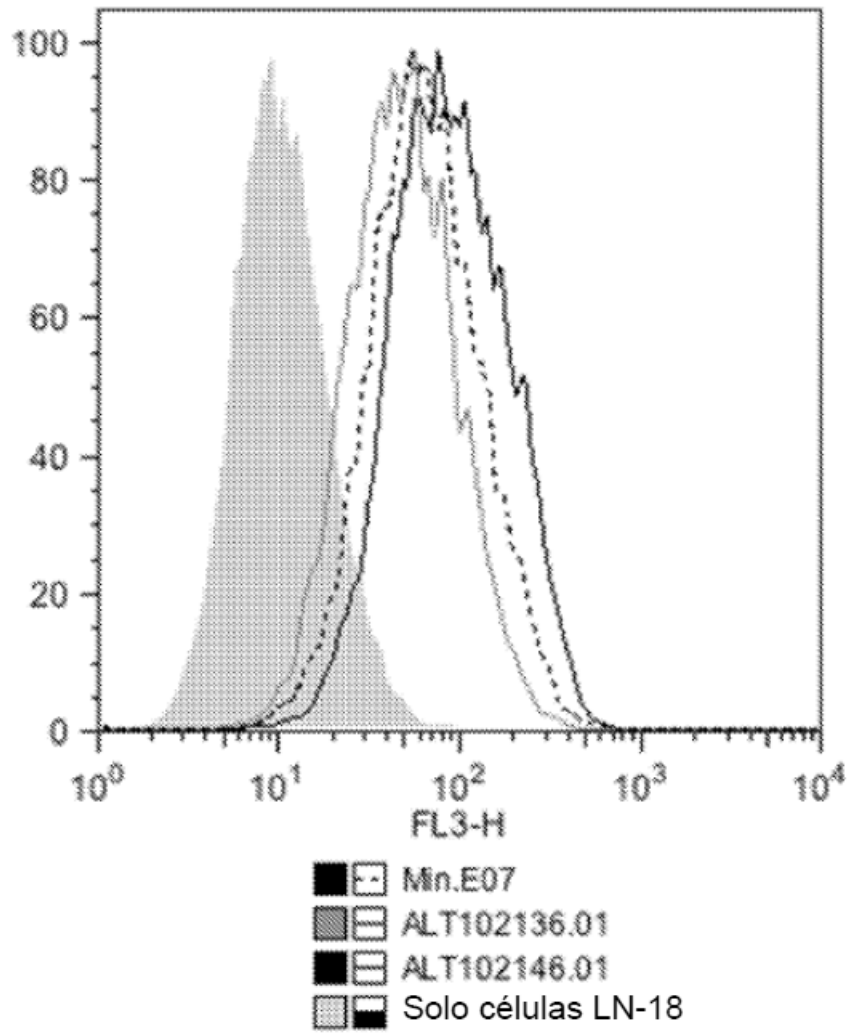


FIGURA 17

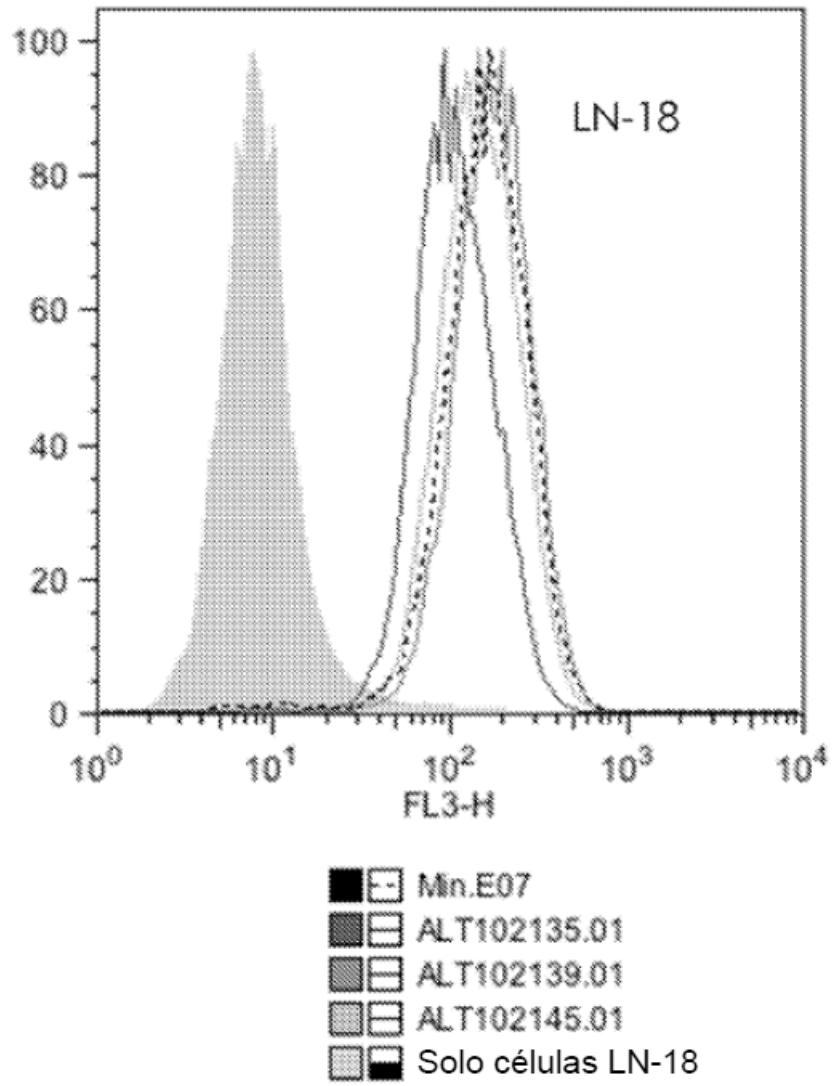


FIGURA 18

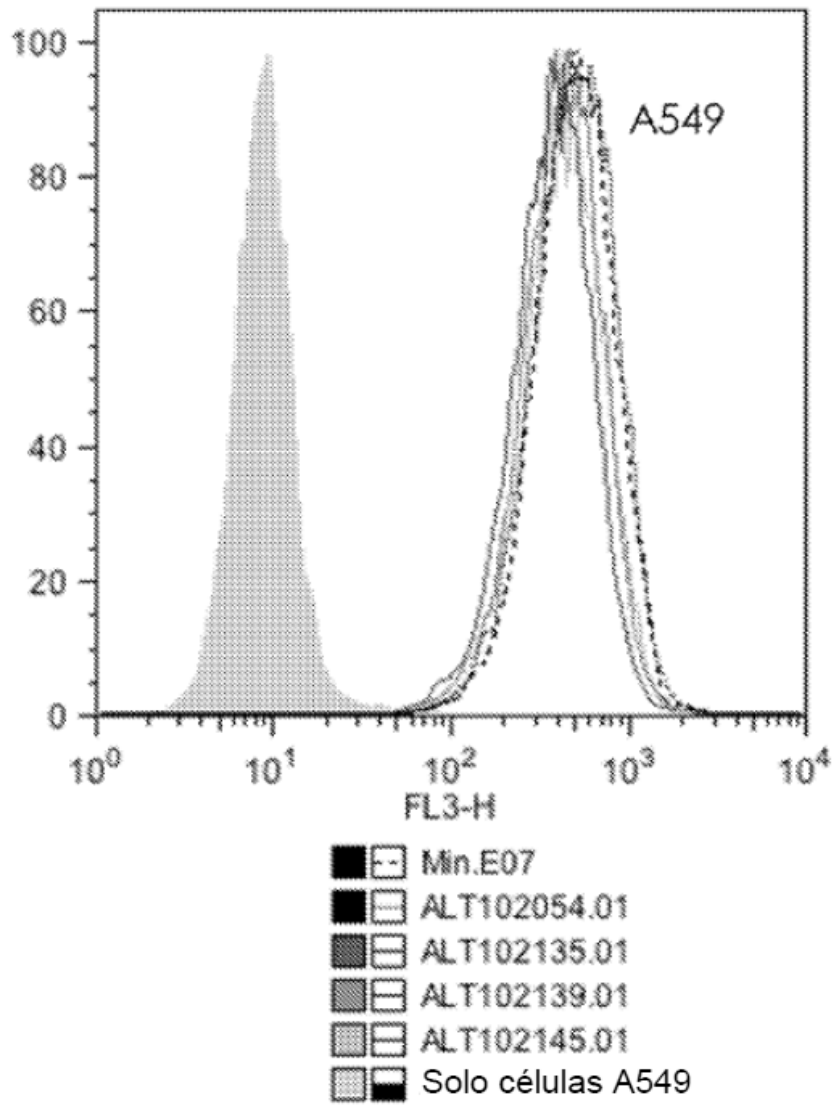


FIGURA 19

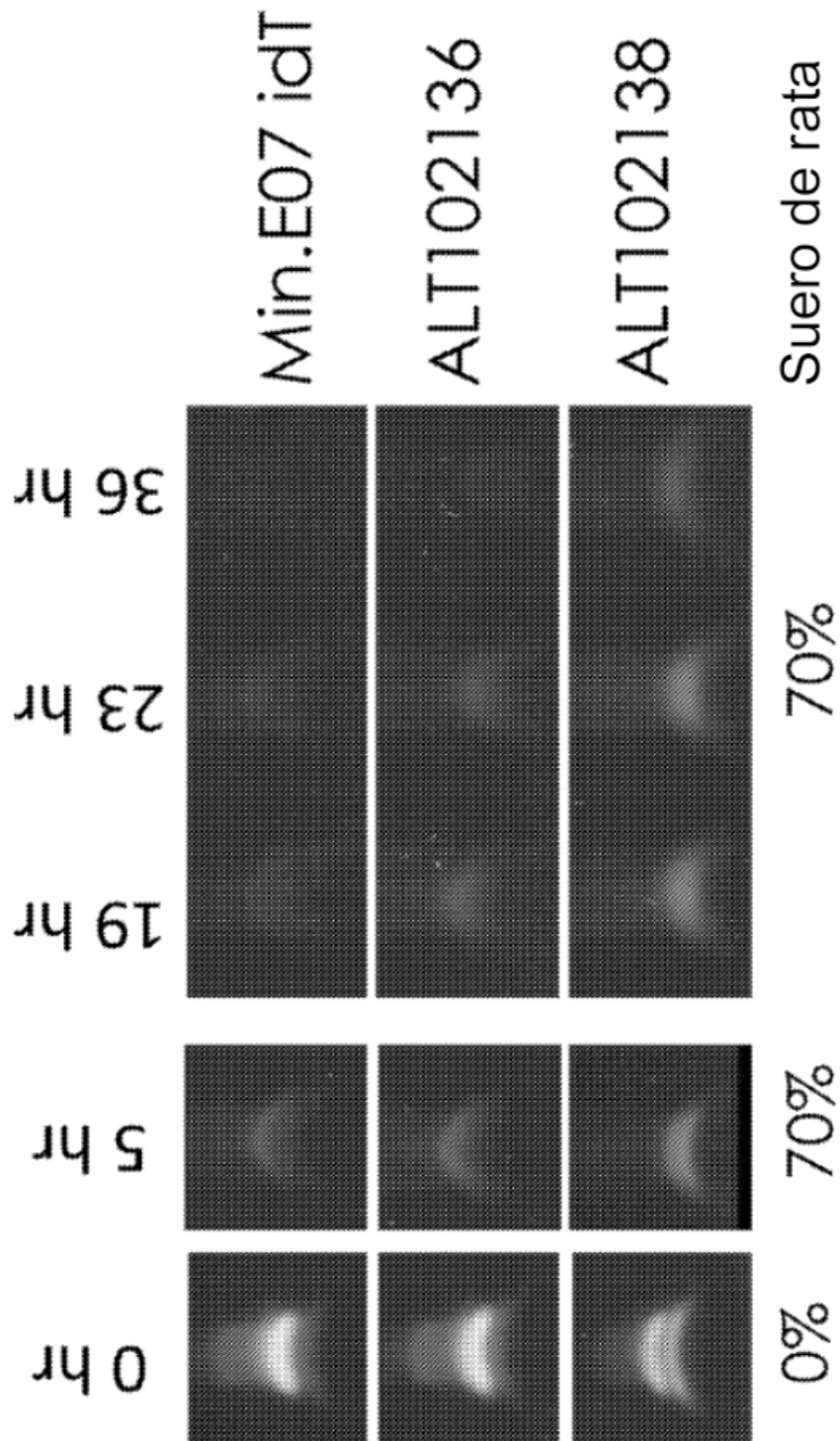


FIGURA 20

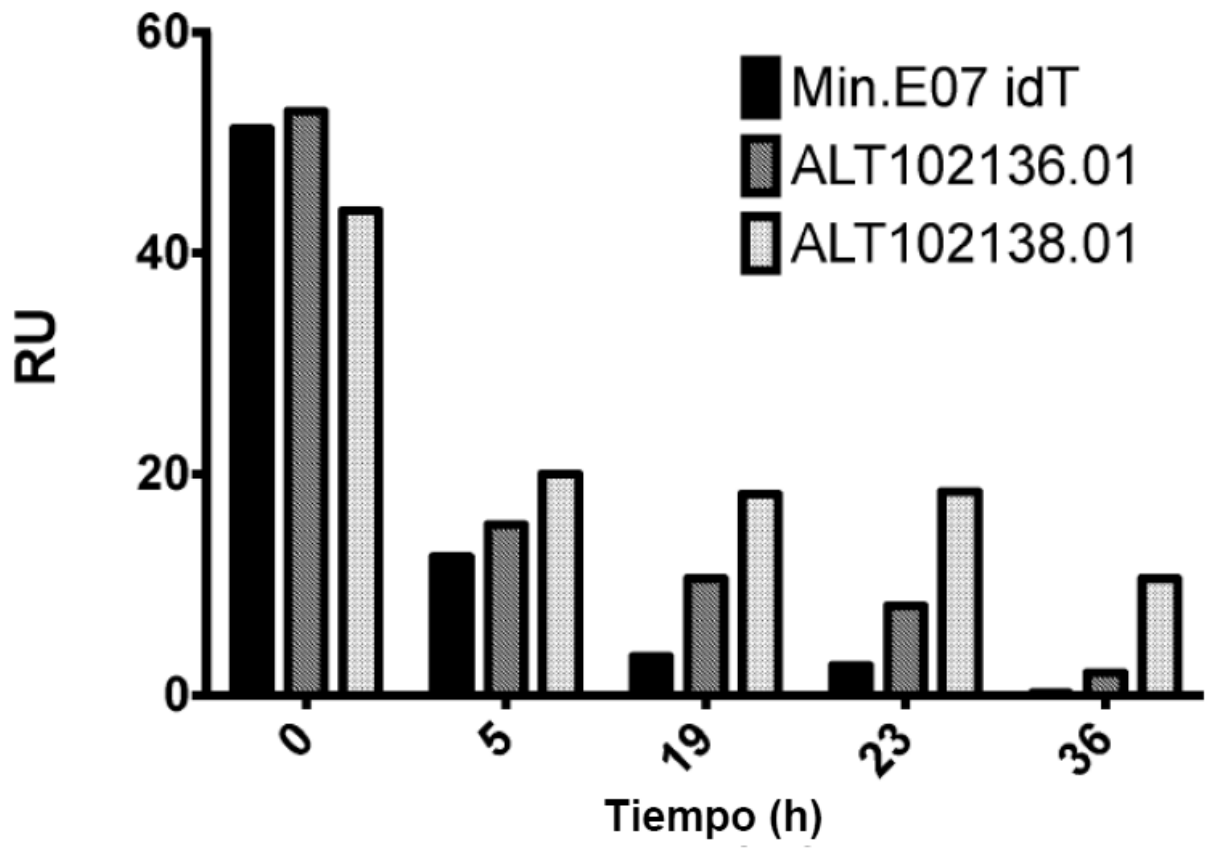


FIGURA 21

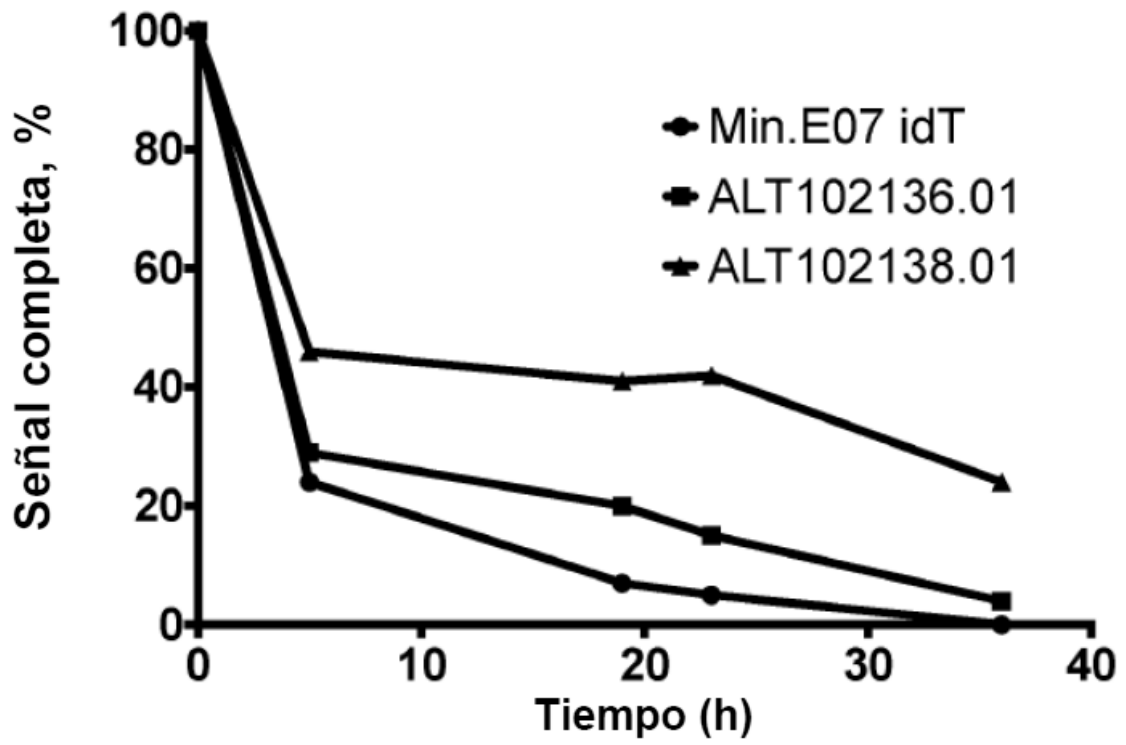


FIGURA 22