

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 949**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2013 PCT/AU2013/000850**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14019024**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013 E 13825421 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2880185**

54 Título: **Aptámeros CD133 para la detección de células madre cancerosas**

30 Prioridad:

**02.08.2012 AU 2012903332**

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

**12.02.2020**

73 Titular/es:

**DEAKIN UNIVERSITY (100.0%)  
75 Pigdons Road  
Waurm Ponds, VIC 3216, AU**

72 Inventor/es:

**DUAN, WEI**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 741 949 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 CD133 para la detección de células madre cancerosas

### 5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a aptámeros de ARN y usos de los mismos, en particular aptámeros que se unen específicamente a CD133 y que muestran una penetración tumoral superior.

### 10 Antecedentes de la invención

CD133, también conocida como Prominina-1 es una glucoproteína de membrana, altamente glucosilada, pentáspica, que se asocia con colesterol en la membrana plasmática. Aunque se sabe que esta proteína define una amplia población de células, incluyendo células madre somáticas y progenitoras, y se expresa en diversas células epiteliales y diferenciadas en desarrollo, su función exacta aún está siendo aclarada. Sin embargo se ha ligado a la ruta de señalización Notch que es crítica para el destino celular binario, la diferenciación del epitelio intestinal y la linfopoyesis (Ulasov *et al.* 2011. *Mol Med* 17:103-12). Se ha mostrado más interés en esta molécula en los últimos años debido a que se cree que es un marcador de células madre cancerosas (CSC) en varios cánceres. De hecho, la evidencia de crecimiento ha mostrado que CD133 se expresa en CSC en varios cánceres, y existe un potencial tumorigénico mejorado de las células CD133<sup>+</sup> frente a sus homólogos negativos en ratones inmunodeprimidos (Dittfeld *et al.* 2009. *Radiother Oncol* 92:353-61).

La inmunoterapia ha tenido un mayor impacto en el tratamiento del cáncer en los últimos años. Sin embargo, el uso de anticuerpos, aún anticuerpos humanizados, puede conducir a efectos secundarios adversos que pueden ser mortales (Hansel *et al.* 2010. *Nat Rev Drug Discov* 9:325-38). Esto ha conducido a la búsqueda por opciones “más grandes y mejores”. Se han realizado varios intentos para usar los ácidos nucleicos como agentes terapéuticos, aunque se ha encontrado que estos tienen resultados decepcionantes, sobre todo por el hecho de que estos ácidos nucleicos no hayan entrado en la célula (Shigdar *et al.* 2011. *Br J Haematol* 155:3-13).

Los anticuerpos químicos, denominados aptámeros, se han utilizado cada vez más para aplicaciones clínicas en los últimos veinte años. De hecho, un aptámero, pegaptanib (un aptámero anti-VEGF) ha sido aprobado por la FDA y algunos más están en ensayos clínicos. El mayor interés en el uso de aptámeros para la terapia se debe a varias razones, incluyendo el hecho de que no muestran inmunogenicidad, poca variación entre lotes debido a la síntesis química, y que son más estables que los anticuerpos convencionales. Debido a su pequeño tamaño, también muestran una penetración tumoral superior. Sin embargo, su característica más importante es la capacidad de unir estos aptámeros a nanopartículas, fármacos, agentes de imagen u otras terapias de ácido nucleico sin pérdida de función (Meng *et al.* 2012. *PLoS One* 7:e33434). Esta funcionalización está conduciendo a terapias nuevas y más específicas, con menos efectos secundarios que las modalidades de tratamiento actuales (Meng *et al.* 2012 anteriormente). Cuando se comparan con el tratamiento convencional, que es en gran parte un procedimiento pasivo, los sistemas de administración dirigidos son mucho más eficaces. Para que un aptámero sea un agente eficaz de administración de fármacos, el aptámero debe unirse a su objetivo en la superficie celular e interiorizarse en un corto periodo de tiempo.

Ferrandina *et al.* (2009), *Expert opinion on Therapeutic Targets* 13(7): 823-837 divulgan anticuerpos contra CD133 y usos de los mismos. El documento WO 03/066097 divulga aptámeros contra CD133/prominina-1.

### Resumen de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones independientes adjuntas y las características preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes. A continuación, las referencias a “ejemplo”, “realizaciones” o “la presente divulgación” deben entenderse como relacionadas con la invención solo en la medida en que estén dentro del alcance de las reivindicaciones.

Recientemente se ha apreciado que las células madre cancerosas son responsables de la formación y el crecimiento del tejido neoplásico y son naturalmente resistentes a la quimioterapia, lo que explica por qué las quimioterapias tradicionales pueden inicialmente reducir el tamaño de un tumor pero no erradicarlo por completo, lo que da como resultado una recidiva final. Según la hipótesis de las células madre cancerosas, las células CD133 positivas determinan el crecimiento tumoral a largo plazo y, por lo tanto, se sospecha que influyen en el resultado clínico. Recientemente se ha encontrado que tanto la proporción de células CD133 positivas como su organización topológica en grupos eran factores pronósticos significativos para la supervivencia sin progresión adversa y la supervivencia general independientemente del grado del tumor, la extensión de la resección o la edad del paciente.

Las técnicas histopatológicas actuales para la detección y el direccionamiento de células madre cancerosas CD133 positivas utilizan sistemas basados en anticuerpos convencionales, pero carecen de sensibilidad debido al tamaño de los anticuerpos anti-CD133 disponibles y su incapacidad relativa para penetrar en los tejidos.

5 Por consiguiente, la generación de aptámeros para células CD133<sup>+</sup> sería ventajosa en la erradicación del cáncer. Esto ha sido abordado por el presente inventor, que ha generado aptámeros específicos para CD133 que se internalizan rápidamente y muestran una penetración tumoral superior.

La presente divulgación proporciona un aptámero de ARN aislado que se une específicamente a CD133. En un ejemplo, el CD133 es CD133 humano.

En un ejemplo, los aptámeros de la presente divulgación tienen una constante de disociación para CD133 expresada en células HT-29 en el intervalo de 82-145 nM. En otro ejemplo, los aptámeros de la presente divulgación tienen una constante de disociación para CD133 expresada en células Hep3B en el intervalo de 32-52 nM.

15 En un ejemplo, el aptámero de ARN aislado comprende una secuencia consenso 5' - CCCUCCUACAUAGGG-3' (SEQ ID NO:1).

En otro ejemplo, el aptámero de ARN aislado comprende una secuencia seleccionada de las siguientes:

20 (i) 5' -GAG ACA AGA AUA AAC GCU CAA CCC ACC CUC CUA CAU AGG GAG GAA CGA GUU ACU AUA GAG CUU CGA CAG GAG GCU CAC AAC- 3' (SEQ ID NO:2);

(ii) 5' -GAG ACA AGA AUA AAC GCU CAA CCC ACC CUC CUA CAU AGG GAG GAA CGA GUU ACU AUA G- 3' (SEQ ID NO:3);

(iii) 5' -GCU CAA CCC ACC CUC CUA CAU AGG GAG GAA CGA GU- 3' (SEQ ID NO:4);

(iv) 5' -CC ACC CUC CUA CAU AGG GUG G- 3' (SEQ ID NO:5); y

30 (v) 5' -CC CUC CUA CAU AGG G- 3' (SEQ ID NO:1).

En otro ejemplo, el aptámero de ARN aislado comprende una secuencia consenso 5' - CAGAACGUAUACUAUUCUG- 3' (SEQ ID NO:6).

35 En otro ejemplo, el aptámero de ARN aislado comprende una secuencia consenso 5' - AGAACGUAUACUAUU- 3' (SEQ ID NO:7).

En otro ejemplo, el aptámero de ARN aislado comprende la secuencia 5' -GAG ACA AGA AUA AAC GCU CAA GGA AAG CGC UUA UUG UUU GCU AUG UUA GAA CGU AUA CUA UUU CGA CAG GAG GCU CAC AAC AGG C- 3' (SEQ ID NO:8).

En un ejemplo particular, la presente divulgación proporciona un aptámero de ARN aislado que presenta una modificación 2'-fluoro-pirimidina y que se une específicamente a CD133.

45 En otro ejemplo, el aptámero de ARN aislado consiste esencialmente en la secuencia de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:6.

En otro ejemplo, el aptámero de ARN aislado consiste en la secuencia de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:6.

50 En otro ejemplo, el aptámero de ARN aislado comprende una secuencia consenso CCCUCCUACAUAGGG (SEQ ID NO:1), o una secuencia consenso CAGAACGUAUACUAUUCUG (SEQ ID NO:6), o una secuencia consenso AGAACGUAUACUAUU (SEQ ID NO:7), donde la longitud de secuencia está entre 15 bases y 100 bases. En otro ejemplo, la longitud está entre 15 y 40 bases. En otro ejemplo, la longitud de secuencia está entre 19 bases y 100 bases. En un ejemplo adicional, la longitud está entre 19 y 40 bases.

La secuencia puede comprender una o más sustituciones de ácidos nucleicos dentro de la secuencia consenso que mantiene el bucle de ligadura del aptámero. En un ejemplo, la secuencia comprende una o más sustituciones dentro de la secuencia consenso. En un ejemplo, la secuencia comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones dentro de la secuencia consenso. En otro ejemplo, la secuencia comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones dentro de la región troncal del aptámero según la SEQ ID

NO:1 o la SEQ ID NO:6. En un ejemplo, la región troncal es aquella de la estructura bidimensional predicha el aptámero.

5 En un ejemplo, el aptámero comprende una o más modificaciones (aptámero modificado) que mejoran la estabilidad del aptámero (in vitro o in vivo). Las modificaciones adecuadas se analizan en otra parte en el presente documento. En un ejemplo, las bases de pirimidina presentan una modificación 2'-fluoro (2'-F). En otro ejemplo, el extremo 3' del aptámero de ARN se modifica para protegerlo de la digestión de nucleasa. En otro ejemplo, el aptámero se modifica acoplado el extremo 5' a un fluoróforo o dT invertido.

10 La presente divulgación también proporciona un aptámero de ARN aislado que tiene sustancialmente la misma capacidad para unirse a CD133 que la de un aptámero que comprende una secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:6, o SEQ ID NO:7.

15 En un ejemplo, el aptámero se une específicamente a la célula o células CD133<sup>+</sup>. En otro ejemplo, la célula o células CD133<sup>+</sup> es una célula o células madre. En otro ejemplo, la célula madre es una célula o células madre de cáncer aisladas. En otro ejemplo, la célula o células madre cancerosas están caracterizadas por que (i) expresan CD133, (ii) son tumorigénicas, (iii) son capaces de auto-renovarse, (iv) son capaces de diferenciarse y (v) son resistentes a la apoptosis mediante métodos de terapia convencionales.

20 Como alternativa, las células madre cancerosas pueden describirse como aisladas, enriquecidas o purificadas de una fuente, tal como una muestra biológica. En otro ejemplo, la célula o células madre cancerosas representan una población de células enriquecidas sobre la base de la expresión de CD133<sup>+</sup>. En otro ejemplo, la población de células comprende al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 95 % de células madre cancerosas.

25 En un ejemplo, las células que expresan CD133 y/o las células madre cancerosas están presentes in vivo. En otro ejemplo, las células que expresan CD133 y/o las células madre cancerosas están presentes in vitro. En un ejemplo adicional, las células que expresan CD133 y/o las células madre cancerosas están presentes en una muestra biológica obtenida de un sujeto.

30 En otro ejemplo, las células que expresan CD133 y/o las células madre cancerosas de la presente divulgación pueden expresar uno o más antígenos adicionales, incluyendo CD44, ABCG2,  $\beta$ -catenina, CD117, ALDH, VLA-2, CD166, CD201, IGFR, EpCAM, y EGF1R.

35 En otro ejemplo, la célula madre cancerosa según la presente divulgación es una célula madre de cáncer de cerebro, una célula madre de cáncer de mama, una célula madre de cáncer de próstata, una célula madre de cáncer de páncreas, una célula madre de cáncer de colon, una célula madre de hígado, una célula madre de pulmón, una célula madre de ovario, una célula madre de piel, o una célula madre de melanoma.

40 La presente divulgación también proporciona un agente de diagnóstico que comprende un aptámero de ARN como se describe en el presente documento.

En un ejemplo, el agente de diagnóstico comprende un aptámero de ARN de la presente divulgación acoplado a una etiqueta detectable.

45 Se apreciará por los expertos en la técnica que los aptámeros de la presente invención evitan complicaciones que se pueden asociar con la unión de anticuerpos no específicos y, por lo tanto, proporcionan una relación de señal-ruido superior.

50 En un ejemplo, el agente de diagnóstico como se describe en el presente documento se utiliza para detectar células madre cancerosas que expresan CD133 in vivo o in vitro.

55 En un ejemplo, el aptámero de ARN de la presente divulgación se puede utilizar para diagnosticar con el fin de detectar la presencia de células que expresan CD133 y/o células madre cancerosas en un sujeto o en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene un tumor o se sospecha que tiene un tumor. La detección se puede facilitar al acoplar el aptámero a una etiqueta detectable. Los ejemplos de etiquetas detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, etiquetas densas en electrones, etiquetas para IRM y materiales radiactivos.

60 La presente divulgación también proporciona un aptámero de ARN como se describe en el presente documento o el agente de diagnóstico como se describe en el presente documento para su uso en el examen histológico de muestras biológicas. Los métodos para preparar preparaciones histológicas resultarán familiares para los expertos en la técnica.

La presente divulgación también proporciona un agente anticanceroso que comprende un aptámero de ARN como se describe en el presente documento.

5 En un ejemplo, el agente anticanceroso comprende un aptámero de ARN de la presente divulgación acoplado a un resto.

En un ejemplo, el agente anticanceroso como se describe en el presente documento se usa para tratar un cáncer en un sujeto. En un ejemplo, el sujeto es uno que se beneficiaría del tratamiento con el aptámero de ARN de la  
10 presente divulgación. En otro ejemplo, el sujeto es uno que ha sido diagnosticado con cáncer. En un ejemplo adicional, el sujeto es uno que tiene un cáncer seleccionado de cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de piel, melanoma o cualquier otro tipo de cáncer donde estén presentes las células CD133<sup>+</sup>.

15 El aptámero de la presente divulgación se puede acoplar a un resto y el aptámero se puede usar para dirigir el resto al sitio de un tumor que comprende, o se sospecha que comprende, una célula o células madre cancerosas que expresan CD133. Los ejemplos de restos incluyen toxinas, radionúclidos o agentes quimioterapéuticos que se pueden usar para destruir células madre cancerosas, o agentes de imagen que se pueden usar para localizar y dimensionar tumores que comprenden células que expresan CD133.

20 El agente anticanceroso que comprende el aptámero de ARN de la presente divulgación puede incluir adicionalmente uno o más ingredientes eficaces.

La presente divulgación también proporciona un método para aislar, purificar o enriquecer una célula o células que  
25 expresan CD133 y/o una célula o células madre cancerosas de una muestra biológica obtenida de un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un aptámero de ARN de la presente divulgación o el agente de diagnóstico de la presente divulgación. En un ejemplo, el método se realiza in vitro.

Los métodos para aislar, purificar o enriquecer células que expresan CD133 son conocidos por los expertos en la  
30 técnica y también se describen en otra parte en el presente documento.

La presente divulgación también proporciona un método para identificar una célula o células que expresan CD133 y/o célula o células madre cancerosas en un sujeto o en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene cáncer, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un aptámero de ARN aislado  
35 de la presente divulgación o el agente de diagnóstico de la presente divulgación.

La presente divulgación también proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que comprende proporcionar a un sujeto un aptámero de ARN como se describe en el presente documento o el agente anticanceroso como se describe en el presente documento.

40 En un ejemplo, el cáncer es cualquier cáncer donde las células que expresan CD133 y/o las células madre cancerosas están presentes o se sospecha que están presentes. En otro ejemplo, el sujeto es uno que ha sido diagnosticado con cáncer. En un ejemplo adicional, el sujeto es uno que tiene un cáncer seleccionado de cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de  
45 pulmón, cáncer de ovario, cáncer de piel, melanoma o cualquier otro tipo de cáncer donde estén presentes las células CD133<sup>+</sup>.

La presente divulgación también se refiere al uso de un aptámero de ARN o un agente anticanceroso como se describe en el presente documento en medicina.

50 La presente divulgación también se refiere al uso de un aptámero de ARN o agente anticanceroso como se describe en el presente documento para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto.

La presente divulgación también se refiere al uso de un aptámero de ARN o agente anticanceroso como se describe  
55 en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto.

La presente divulgación también se refiere a un agente de administración que comprende un aptámero de ARN como se describe en el presente documento acoplado a un ARNsi o ribozima.

60 La presente divulgación también proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de ARN, agente anticanceroso o agente de administración como se describe en el presente documento, junto con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación también proporciona un aptámero de ARN como se describe en el presente documento o el agente de diagnóstico como se describe en el presente documento para su uso en la obtención de imágenes moleculares de tumores.

5 La capacidad de penetración tumoral de los aptámeros de ARN de la presente invención proporciona una clara ventaja sobre los anticuerpos para la obtención de imágenes moleculares de tumores. Por ejemplo, los aptámeros de ARN se pueden acoplar a un agente que facilita la detección y la obtención de imágenes de tumores que llevan células que expresan CD133. Los ejemplos de agentes adecuados incluyen las etiquetas de detección que se describen en el presente documento.

El aptámero de ARN, el agente de diagnóstico, el agente anticanceroso, el agente de administración o la composición farmacéutica, como se describe en el presente documento, se pueden usar en solitario o en combinación con otras modalidades de tratamiento. Por ejemplo, el aptámero de ARN, el agente de diagnóstico, el agente anticanceroso, el agente de administración o la composición farmacéutica se pueden usar en combinación con quimioterapia y/o radioterapia. Si desear quedar ligado a la teoría, se postula que los agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos se pueden usar para reducir el tamaño de los tumores dirigiéndose principalmente a las células que se dividen rápidamente, que son típicamente las células de la progenie de las células madre cancerosas. El agente de diagnóstico puede usarse para determinar la eficacia de cualquier modalidad de tratamiento anterior para eliminar las células madre cancerosas detectando la presencia o ausencia de células madre cancerosas en el tumor. El agente anticanceroso, el agente de administración o la composición farmacéutica que contiene el aptámero de ARN de la presente divulgación se pueden administrar entonces en el sitio del tumor para agotar específicamente las células madre cancerosas. Por consiguiente, el agente anticanceroso, el agente de administración o la composición farmacéutica que contienen el aptámero de ARN se pueden usar junto con quimioterapia o radioterapia o después de un tratamiento de quimioterapia o radioterapia. También se contempla que el aptámero de ARN de la presente divulgación se puede combinar con uno o más aptámeros adicionales que se dirigen a un antígeno presente en una célula madre cancerosa.

Se tomará cada ejemplo de la divulgación para aplicarse *mutatis mutandis* a un método para tratar, prevenir o mejorar el cáncer en un sujeto.

Se tomará cada ejemplo de la divulgación para aplicarse *mutatis mutandis* a la obtención de imágenes moleculares de tumores.

### 35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**Figura 1.** Secuencia de aptámeros de ARN; un aptámero de ARN CD133 de 15 mer designado CD133- 1-2-2 (SEQ ID NO:1) y un aptámero de ARN CD133 de 19 mer designado CD133-2-1 (SEQ ID NO:6).

40 La modificación de base, el ARN de 2'-F-pirimidina, citidina (C) y uridina (U) presentan una modificación 2'-F (véase el subrayado en la figura). IDT-3' para protegerlo de la digestión con nucleasas. Purificación de grado de HPLC de ARN, posterior a la síntesis: 2'-desprotección/desalación.

**Figura 2.** Aislamiento de aptámeros CD133 utilizando la evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX).

45 (A) Análisis de unión por citometría de flujo de aptámeros marcados con FITC de rondas iterativas de SELEX con respecto a células HEK293T transfectadas con CD133. El ARN marcado con fluoresceína de cada ronda se incubó con células diana a 37 °C durante 30 minutos, seguido de un análisis de citometría de flujo. (B) La unión de cada ronda se calculó después de restar la intensidad fluorescente media de la unión del ARN de la biblioteca no seleccionado a las células diana, así como la de la unión a las células de control negativo. R, ronda en ciclo SELEX; R, biblioteca aleatoria no seleccionada.

**Figura 3.** Determinación de las constantes de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) para la interacción de clones truncados de aptámeros CD133.

Curvas de unión representativas a concentraciones variables de aptámeros CD133 (1-200 nM) a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/ml. (A) Células HT-29; (B) Células Hep3B; (C) Células T98G; (D) Células HEK293T.

60 **Figura 4** Truncamiento de aptámeros CD133.

(A) CD133-1 se truncó en serie un total de 4 veces (i): CD133-1; (ii): CD133-1-1, (iii): CD133-1-2, (iv): CD133-1-2-1,

(v): CD133-1-2-2); (B) (i) CD133-2 se truncó una vez (ii) CD133-2-1.

**Figura 5.** Los aptámeros CD133 se endocitan después de la unión a células CD133 positivas pero no a células CD133 negativas.

5 Los aptámeros CD133 marcados con DY647 se incubaron con las células cancerosas indicadas durante 30 min a 37 °C seguido de obtención de imágenes con microscopía confocal de barrido láser. Para cada par de paneles, las imágenes ópticas (fase) están en la parte superior, y las imágenes fluorescentes están en la parte inferior. HT-29 y Hep3B son células de cáncer de colon e hígado humano, respectivamente, que expresan CD133. T98G son células de glioma humano que no expresan CD133. HEK293T es una línea celular no tumoral humana que no expresa CD133. Línea de escala - 20 µm.

**Figura 6.** Los aptámeros CD133 se endocitan después de la unión a células CD133 positivas pero no a células CD133 negativas.

15 Después del tratamiento (agotamiento de potasio) que detiene la endocitosis, los aptámeros ya no entran en las células, sino que permanecen en la superficie celular (formando una estructura anular en lugar del patrón particulado). La transferrina se utiliza como control positivo para mostrar la eficacia del tratamiento para detener la endocitosis de la transferrina. HT-29: líneas celulares de cáncer de colon, Hep3B: línea celular de cáncer de hígado humano. Los aptámeros CD133 marcados con DY647 se incubaron con las células cancerosas indicadas durante 30 min a 37 °C seguido de obtención de imágenes con microscopía confocal de barrido láser. Para cada par de paneles, las imágenes ópticas (fase) están en la parte superior, y las imágenes fluorescentes están en la parte inferior. Línea de escala - 20 µm.

25 **Figura 7** Los aptámeros de ARN CD133 penetran en la masa tumoral mucho mejor que el anticuerpo CD133 (AC 133).

Se cultivaron células de cáncer de colon humano CD133<sup>+</sup> (HT-29) y células epiteliales de riñón humano CD133<sup>-</sup> (HEK293T) en DMEM libre de suero/medio F12 complementado con factor de crecimiento de fibroblastos (10 ng/ml) y factor de crecimiento epidérmico (10 ng/ml), insulina (50 µg/ml) y B27 (100 unidades/ml), para permitir la formación de tumoresfera. Cuando las esferas alcanzaron un tamaño de 300 µm, las esferas se incubaron con aptámeros de ARN CD133 marcados con Dy647 100 nM o aptámero de control, así como con una concentración equivalente de anticuerpos PE-CD133 (AC133) por separado durante 4 h. Después del lavado con PBS 3 veces, se obtuvieron imágenes de las esferas utilizando microscopía de fluorescencia confocal. Se mostraron las dos secciones centrales (intermedias).

#### Código a la lista de secuencias

40 **SEQ ID NO:1:** es la secuencia para el aptámero CD133-2-2 (15 mer)

**SEQ ID NO:2:** es la secuencia para el aptámero CD133-1 (81 mer)

**SEQ ID NO:3:** es la secuencia para el aptámero CD133-1-1 (58 mer)

45 **SEQ ID NO:4:** es la secuencia para el aptámero CD133-1-2 (35 mer)

**SEQ ID NO:5:** es la secuencia para el aptámero CD133-1-2-1 (21 mer)

50 **SEQ ID NO:6:** es la secuencia para el aptámero CD133-2-1 (19 mer)

**SEQ ID NO:7:** es una secuencia consenso del aptámero CD133 (15 mer)

**SEQ ID NO:8:** es la secuencia para el aptámero CD133-2 (85 mer)

#### 55 **Descripción detallada de la invención**

##### Técnicas generales y definiciones seleccionadas

60 El término “y/o”, por ejemplo, “X y/o Y” se entenderá que significa “X e Y” o “X o Y” y se tomará para proporcionar apoyo explícito para ambos significados o para cualquiera de los dos significados.

Cualquier análisis de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se haya incluido en la

presente memoria descriptiva no debe considerarse como una admisión de que cualquiera o todos estos asuntos forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimiento general común en el campo relevante para la presente divulgación tal como existía antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

- 5 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario, o el contexto lo requiera de otro modo, se debe considerar que la referencia a una sola etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de la materia englobarán uno y una pluralidad (es decir, uno o más) de estas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.
- 10 Cada ejemplo descrito en el presente documento se aplicará *mutatis mutandis* a todos y cada uno de los demás ejemplos de la divulgación, a menos que se indique específicamente de otro modo.

Los expertos en la técnica apreciarán que la divulgación es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Debe entenderse que la divulgación incluye todas estas variaciones y modificaciones.

- 15 La divulgación también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o cualesquiera dos o más de dichas etapas o características.

- La presente divulgación no debe estar limitada en su alcance por los ejemplos específicos descritos en el presente documento, que están destinados solo para fines de ilustración. Los productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la divulgación.
- 20

La presente divulgación se realiza sin demasiada experimentación utilizando, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular, tecnología de ADN recombinante, biología celular e inmunología.

- 25 Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Segunda Edición (1989), la totalidad de los Vol. I, II, y III; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vol. I y II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, la totalidad del texto; *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, la totalidad del texto, y particularmente los artículos en el mismo de Gait, págs. 1-22; Atkinson *et al*, págs. 35-81; Sproat *et al*, págs. 83-115; y Wu *et al*, págs. 135-151; 4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, la totalidad del texto; *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (1986) IRL Press, Oxford, la totalidad del texto; Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), la totalidad de la serie, Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 336- 342; Merrifield, R.B. (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154; Barany, G. y Merrifield, R.B. (1979) en *The Peptides* (Gross, E. y Meienhofer, J. eds.), vol. 2, págs. 1-284, Academic Press, Nueva York. 12. Wunsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Miiller, E., ed.), vol. 15, 4ª ed., Partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474; *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); y *Animal Cell Culture: Practical Approach*, Tercera Edición (John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, la totalidad del texto.
- 30
- 35
- 40

- A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, implican la inclusión de una etapa o elemento o integrante o grupo de etapas establecido, o elementos o enteros, pero no la exclusión de ninguna otra etapa o elemento o integrante o grupo de elementos o integrantes.
- 45

- Se entenderá que el término “consiste en” o “que consiste en” significa que un método, procedimiento o composición de materia tiene las etapas y/o componentes mencionados y ninguna etapa o componentes adicionales.
- 50

- El término “aproximadamente”, como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible, tal como una cantidad de peso, tiempo, dosis, etc., pretende abarcar variaciones de  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , más preferiblemente de  $\pm 5\%$ , incluso más preferiblemente  $\pm 1\%$ , y aún más preferiblemente  $\pm 0,1\%$  de la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar el método descrito.
- 55

- El término “aptámero”, como se usa en el presente documento, se refiere en general a un oligonucleótido de una única secuencia definida o a una mezcla de dichos oligonucleótidos, donde la mezcla conserva las propiedades de unión específicamente a CD133. Como se usa en el presente documento, “aptámero” se refiere a ácido nucleico monocatenario. Estructuralmente, los aptámeros de la presente divulgación son oligonucleótidos de unión específica.
- 60

El término “oligonucleótido”, como se usa en el presente documento, es genérico para polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2'-desoxi-D-ribosa o formas modificadas de la misma), es decir, ADN, para polirribonucleótidos (que contienen D ribosa o formas modificadas de la misma), es decir, ARN, y para cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glucósido o C-glucósido de una base de purina o pirimidina, o una base de purina o pirimidina modificada o nucleótidos abásicos. Según la presente divulgación, el término “oligonucleótido” incluye no solo aquellos con bases convencionales, residuos de azúcar y enlaces internucleotídicos, sino también aquellos que contienen modificaciones de cualquiera o todos estos tres restos.

El término “aptámero de ARN” como se usa en el presente documento es un aptámero que comprende unidades de ribonucleósido. El aptámero de ARN también pretende abarcar los análogos de ARN como se define en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “afinidad de unión” y actividad de unión” se refieren a la tendencia de una molécula de ligando/aptámero a unirse o no a un objetivo y describe la medida de la fuerza de la unión o afinidad de la molécula ligando/aptámero para unirse al objetivo. La energía de dichas interacciones es significativa en la “actividad de unión” y la “afinidad de unión” porque definen las concentraciones necesarias de los compañeros de interacción, las velocidades a las que estos compañeros son capaces de asociarse, y las concentraciones relativas de moléculas unidas y libres en una solución. La energía se caracteriza en el presente documento a través de, entre otras formas, la determinación de una constante de disociación,  $K_d$ . Como se conoce en la técnica, una constante de disociación baja indica una unión más fuerte y afinidad de las moléculas entre sí. En un ejemplo, la constante de disociación es al menos  $10^{-6}$  M. En otro ejemplo, la constante de disociación es al menos  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  M.

Como se utiliza en el presente documento, el término “muestra biológica” se refiere a una célula o población de células o una cantidad de tejido o fluido de un sujeto. Más frecuentemente, la muestra se ha extraído de un sujeto, pero el término “muestra biológica” también puede referirse a células o tejido analizados in vivo, es decir sin extracción del sujeto. Frecuentemente, una “muestra biológica” contendrá células del sujeto, pero el término también puede referirse a material biológico no celular, tal como fracciones no celulares de sangre, saliva, u orina, que se pueden utilizar para medir los niveles de expresión génica. Las muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, biopsias de tejido, biopsias de aguja, raspados (por ejemplo, raspados bucales), sangre entera, plasma, suero, linfa, médula ósea, orina, saliva, esputo, cultivo celular, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido ascítico, o líquido cefalorraquídeo. Las muestras biológicas también incluyen biopsias de tejido y cultivos celulares. Una muestra biológica o muestra de tejido puede referirse a una muestra de tejido o fluido aislado de un individuo, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, sangre, plasma, suero, biopsia de tumor, orina, heces, esputo, líquido espinal, líquido pleural, aspirados de pezón, líquido linfático, las secciones externas de la piel, tracto respiratorio, intestinal y genitourinario, lagrimas, saliva, leche, células (incluyendo, pero sin limitación, células sanguíneas), tumores, órganos, y también muestras de constituyente de cultivo celular in vitro. En algunas realizaciones, la muestra es de una resección, biopsia broncoscópica, o biopsia con aguja gruesa de un tumor primario o metastásico, o un bloque de células del líquido pleural. Además, se pueden utilizar muestras de aspirado con aguja fina. Las muestras pueden ser tejidos incluidos en parafina o congelados. La muestra se puede obtener eliminando una muestra de células de un sujeto, pero también se puede lograr al utilizar células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona), o al llevar a cabo los métodos de la invención in vivo.

El término “acoplado a” como se usa en el presente documento pretende abarcar cualquier construcción mediante la cual el aptámero de ARN se liga, se une o se junta a un agente de detección, resto, ARNsi o ribozima como se describe en el presente documento. Los expertos en la técnica conocerán los métodos para realizar el acoplamiento e incluyen, pero sin limitación, la conjugación, la unión a través de un enlazador peptídico o por la síntesis química directa del ARN y el agente (por ejemplo, ARNsi o ribozima) como una cadena completa.

El término “aislado”, como se usa en el presente documento, pretende referirse al aptámero de ARN o la célula madre (por ejemplo, célula madre cancerosa), aislable o purificado a partir de otros componentes. Una célula aislada se refiere a una célula del entorno donde puede aparecer naturalmente. La célula aislada puede purificarse en cualquier grado con respecto a su estado obtenible naturalmente.

El término “ligando”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula u otra entidad química que tiene una capacidad para unirse a un objetivo. Un ligando puede comprender un péptido, un oligómero, un ácido nucleico (por ejemplo, un aptámero), una molécula pequeña (por ejemplo, un compuesto químico), un anticuerpo o fragmento del mismo, la fusión ácido nucleico-proteína y/o cualquier otro agente de afinidad. Por lo tanto, un ligando puede provenir de cualquier fuente, incluidas las bibliotecas, particularmente las bibliotecas combinatorias, tales como las bibliotecas de aptámeros divulgadas a continuación en el presente documento, las bibliotecas de presentación de fagos, o cualquier otra biblioteca como sería evidente para un experto en la técnica después de la revisión de la divulgación en el presente documento.

El término “aptámero de ARN modificado”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula polimérica que, además de contener ribonucleósidos como sus unidades, también contiene al menos uno de los siguientes: 2'-desoxi, 2'-halo (incluyendo 2'-fluro), 2'-amino (preferiblemente no sustituido o mono o disustituido), 2'-mono, di o tri-halometilo, 2'-O-alquilo, alquilo 2'-O-halo-sustituido, 2'-alquilo, azido, fosforotioato, sulfhidrilo, metilfosfonato, fluoresceína, rodamina, pireno, biotina, xantina, hipoxantina, 2,6-diamino purina, 2-hidroxi-6-mercaptapurina y bases de pirimidina sustituidas en la posición 6 con azufre, o la posición 5 con halo o grupos alquilo C<sub>15</sub>, enlazadores abásicos, 3'-desoxi-adenosina, así como otro “terminador de cadena” disponible o análogos “no extensibles” (en el extremo 3' del ARN), o etiquetas, tales como <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P y similares. Todos los anteriores pueden incorporarse en un ARN utilizando las técnicas de síntesis estándar divulgadas en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” debe entenderse como una cantidad suficiente de aptámero de ARN, agente anticanceroso, agente de administración o composición farmacéutica según la presente divulgación para reducir o inhibir el número de células madre cancerosas que expresan CD133 y/o uno o más síntomas de cáncer. El experto en la técnica sabrá que tal cantidad variará dependiendo, por ejemplo, del sujeto en particular y/o el tipo o gravedad o nivel de la enfermedad. El término no se debe interpretar para limitar la presente divulgación a una cantidad específica de aptámero de ARN.

Como se usa en el presente documento, se entenderá que el término “tratar” o “tratamiento” o “que trata” significa administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de aptámero de ARN, agente anticanceroso, agente de administración o composición farmacéutica como se describe en el presente documento, y reducir o inhibir al menos un síntoma de una afección clínica asociada o causada por el cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término “prevenir” o “que previene” o “prevención” debe entenderse como administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de aptámero de ARN, agente anticanceroso, agente de administración o composición farmacéutica según la presente divulgación, y detención u obstaculización o retraso del desarrollo o la progresión de al menos un síntoma de cáncer.

Como se usa en este documento, el término “se une específicamente” debe entenderse como que el aptámero de ARN reacciona o se asocia con mayor frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia en particular que con células o sustancias alternativas. Por ejemplo, un aptámero de ARN que se une específicamente a una proteína objetivo se une a esa proteína o un epítipo o fragmento inmunogénico de los mismos con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que con los que se une a proteínas y/o epítipos no relacionados o inmunógenos fragmentos de los mismos. También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, un aptámero de ARN que se une específicamente a un primer objetivo puede o no unirse específicamente a un segundo objetivo. Como tal, la “unión específica” no necesariamente requiere una unión exclusiva o una unión no detectable de otra molécula, esto se incluye por el término “unión selectiva”. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa la unión específica. La especificidad de la unión se define en términos de las constantes de disociación comparativas (Kd) del aptámero para el objetivo en comparación con la constante de disociación con respecto al aptámero y otros materiales en el entorno o moléculas no relacionadas en general. Típicamente, la Kd para el aptámero con respecto al objetivo será 2 veces, 5 veces o 10 veces menor que la Kd con respecto al objetivo y el material no relacionado o el material que lo acompaña en el entorno. Incluso más preferiblemente, la Kd será 50 veces, 100 veces o 200 veces menos.

El término “CD133<sup>+</sup>” o “célula que expresa CD133” como se usa en el presente documento se puede usar indistintamente. El término abarca la expresión en la superficie celular del antígeno CD133 que puede detectarse por cualquier medio adecuado. En un ejemplo, la referencia a una célula que es positiva para un marcador dado, significa que puede ser que tenga una expresión baja (lo o dim) o alta (bright, bri) de ese marcador, dependiendo del grado en que el marcador esté presente sobre la superficie celular, donde los términos se refieren a intensidad de fluorescencia.

Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” debe entenderse como cualquier sujeto, incluido un sujeto humano o no humano. El sujeto no humano puede incluir primates no humanos, ungulados (bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos y bisontes), caninos, felinos, lagomorfos (conejos, liebres y picas), roedores (ratón, rata, cobaya, hámster y jerbo), aves, y peces. En un ejemplo, el sujeto es un ser humano.

#### Aptámeros

Varias propiedades únicas de los aptámeros los convierten en herramientas atractivas para su uso en una amplia gama de aplicaciones de biología molecular, y como posibles agentes farmacéuticos. Primero, la mayoría de los aptámeros se unen a objetivos con alta afinidad, demostrando constantes de disociación típicas en el rango pico a nanomolar. Los sitios de unión para aptámeros incluyen hendiduras y surcos de moléculas objetivo que dan como

resultado una actividad antagonista muy similar a la de muchos agentes farmacéuticos disponibles actualmente. En segundo lugar, los aptámeros son estructuralmente estables en un amplio rango de condiciones de temperatura y almacenamiento, manteniendo la capacidad de formar sus estructuras terciarias únicas. En tercer lugar, los aptámeros se pueden sintetizar químicamente, en contraste con los sistemas biológicos costosos y que requieren gran cantidad de trabajo, necesarios para producir anticuerpos monoclonales.

Sin desear quedar ligado a la teoría, los aptámeros de ARN son generalmente preferidos por muchos grupos debido a la afinidad teóricamente mayor de los aptámeros de ARN por sus proteínas objetivo, así como a la mayor estabilidad en plasma del ARN modificado que del ARN no modificado.

10

En el presente documento se divulgan moléculas de aptámero de ARN que se unen específicamente al antígeno CD133 que se puede usar para la administración intracelular eficaz de ARNsi o ribozima, fármacos de quimioterapia, radioisótopos, toxinas y/u otros agentes portadores del antígeno.

15 Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios o análogos de oligonucleótidos que se unen a una molécula objetivo particular, tal como una proteína o una molécula pequeña. Por lo tanto, los aptámeros son la analogía de los oligonucleótidos con los anticuerpos. En general, los aptámeros comprenden de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos, y más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos, en el sentido de que pueden prepararse oligonucleótidos de una longitud que se encuentra dentro de estos intervalos mediante técnicas convencionales. Opcionalmente, los aptámeros pueden comprender además un mínimo de aproximadamente 6 nucleótidos, preferiblemente 10, y más preferiblemente 14 o 15 nucleótidos, que son necesarios para realizar la unión específica. Los aptámeros de regiones de unión que contienen secuencias más cortas de 10, por ejemplo, 6 mer, son factibles si se puede obtener la interacción apropiada en el contexto del entorno donde se coloca el objetivo. Por lo tanto, si hay poca interferencia por otros materiales, se puede requerir menos especificidad y menos fuerza de unión.

La unión a aptámeros es altamente dependiente de la estructura secundaria formada por el oligonucleótido de aptámero. Se conocen aptámeros tanto de ARN como de ADN monocatenario (o análogo). Véanse, por ejemplo, Burke et al (1996). J. Mol. Biol. 264:650-666; Ellington y Szostak (1990). Nature 346:818-22; Hirao et al (1998). Mol Divers. 4:75-89; Jaeger et al (1998). EMBO Journal 17:4535; Kensch et al (2000). J. Biol. Chem 275:18271-8; Schneider et al (1995). Biochemistry 34:9599-9610; y los documentos US 5773598; US6028186; US 6110900; US6127119; y US 6171795.

### 35 Selección de aptámeros para un objetivo determinado

Los aptámeros que se unen a prácticamente cualquier objetivo particular pueden seleccionarse utilizando un procedimiento iterativo llamado SELEX™ (evolución sistémica de ligandos por enriquecimiento exponencial). El procedimiento se describe en, por ejemplo, los documentos US 5270163 y US 5475096. El procedimiento SELEX™ se basa en la idea única de que los ácidos nucleicos tienen la capacidad suficiente para formar una diversidad de estructuras bidimensionales y tridimensionales y una versatilidad química suficiente disponible dentro de sus monómeros para actuar como ligandos (es decir, formar pares de unión específicos) con prácticamente cualquier compuesto químico, ya sea monomérico o polimérico. Las moléculas de cualquier tamaño o composición pueden servir como objetivos.

45

El procedimiento SELEX™ se basa, como punto de partida, en una gran biblioteca o agrupamiento de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden secuencias aleatorias. Los oligonucleótidos pueden ser híbridos de ADN, ARN o ADN/ARN modificados o no modificados. En algunos ejemplos, el agrupamiento comprende el 100 % de oligonucleótidos aleatorios o parcialmente aleatorios. En otros ejemplos, el agrupamiento comprende oligonucleótidos aleatorios o parcialmente aleatorios que contienen al menos una secuencia fija y/o secuencia conservada incorporada dentro de secuencia aleatoria. En otros ejemplos, el agrupamiento comprende oligonucleótidos aleatorios o parcialmente aleatorios que contienen al menos una secuencia fija y/o secuencia conservada en su extremo 5' y/o 3' que puede comprender una secuencia compartida por todas las moléculas del agrupamiento de oligonucleótidos. Las secuencias fijas son secuencias comunes a los oligonucleótidos en el agrupamiento que se incorporan para un propósito preseleccionado tal como, por ejemplo, motivos CpG, sitios de hibridación para cebadores de PCR, secuencias promotoras de ARN polimerasas (por ejemplo, T3, T4, T7 y SP6), sitios de restricción, o secuencias homopoliméricas, tales como tracts poli A o poli T, núcleos catalíticos, sitios para la unión selectiva a columnas de afinidad, y otras secuencias para facilitar la clonación y/o la secuenciación de un oligonucleótido de interés. Las secuencias conservadas son secuencias, distintas de las secuencias fijas descritas anteriormente, compartidas por varios aptámeros que se unen al mismo objetivo.

60

Los oligonucleótidos del agrupamiento incluyen preferiblemente una porción de secuencia aleatoria, así como

secuencias fijas necesarias para una amplificación eficiente. Típicamente, los oligonucleótidos del agrupamiento de partida contienen secuencias terminales fijas 5' y 3' que flanquean una región interna de 30-50 nucleótidos aleatorios. Los nucleótidos aleatorizados pueden producirse de varias formas, incluida la síntesis química y la selección de tamaño a partir de ácidos nucleicos celulares escindidos al azar. La variación de secuencia en los 5 ácidos nucleicos de prueba también se puede introducir o aumentar mediante mutagénesis antes o durante las iteraciones de selección/amplificación.

La porción 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 10 nucleótidos (véanse, por ejemplo, los documentos US 5958691, US 5660985 y WO 92/07065). Los oligonucleótidos aleatorios pueden sintetizarse a partir de nucleótidos unidos a fosfodiéster usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Froehler et al., (1986). Nucl. Acid Res. 14:5399-5467 y Froehler et al (1986) Tet. Lett. 27:5575-5578. Los oligonucleótidos aleatorios también se pueden sintetizar usando métodos de fase de solución tales como métodos de síntesis de triésteres. Véanse, por 15 ejemplo, Sood et al (1977). Nucl. Acid Res. 4:2557 y Hirose et al (1978). Tet. Lett., 28:2449. Las síntesis típicas realizadas en equipos automatizados de síntesis de ADN producen  $10^{14}$ - $10^{16}$  moléculas individuales, un número suficiente para la mayoría de los experimentos SELEX™.

La biblioteca de partida de oligonucleótidos puede generarse por síntesis química automatizada en un sintetizador 20 de ADN. Se pueden crear secuencias parcialmente aleatorias añadiendo los cuatro nucleótidos en diferentes relaciones molares en cada etapa de adición.

La biblioteca de partida de oligonucleótidos puede ser ARN o ADN. En aquellos casos donde se utiliza una biblioteca de ARN como la biblioteca de partida, se genera típicamente mediante la transcripción de una biblioteca de ADN in 25 vitro utilizando ARN polimerasa T7 o ARN polimerasas T7 modificadas y se purifica. La biblioteca de ARN o ADN se mezcla entonces con el objetivo en condiciones favorables para la unión y se somete a iteraciones por etapas de unión, división y amplificación, utilizando el mismo esquema de selección general, para lograr prácticamente cualquier criterio deseado de afinidad de unión y selectividad. Más específicamente, comenzando con una mezcla que contiene el agrupamiento de partida de ácidos nucleicos, el método SELEX™ incluye las etapas de: (a) poner 30 en contacto la mezcla con el objetivo en condiciones favorables para la unión; (b) dividir los ácidos nucleicos no unidos de aquellos ácidos nucleicos que se han unido específicamente a moléculas objetivo; (c) disociar los complejos de ácido nucleico-objetivo; (d) amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-objetivo para producir una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos; y (e) retirar las etapas de unión, división, disociación y amplificación a través de tantos ciclos como se desee para producir ligandos de ácido 35 nucleico de alta afinidad altamente específicos para la molécula objetivo. En aquellos casos donde se seleccionan aptámeros de ARN, el método SELEX™ comprende además las etapas de: (i) transcribir de manera inversa los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-objetivo antes de la amplificación en la etapa (d); y (ii) transcribir los ácidos nucleicos amplificados de la etapa (d) antes de reiniciar el procedimiento.

40 Los ciclos de selección y amplificación se repiten hasta que se logra un objetivo deseado. Generalmente esto es hasta que no se logre una mejora significativa en la resistencia de la unión al repetir el ciclo. Típicamente, las moléculas de aptámero de ácido nucleico se seleccionan en un procedimiento de 5 a 20 ciclos.

Se sabe que existe una diversidad de estructuras primarias, secundarias y terciarias de ácidos nucleicos. Las 45 estructuras o los motivos que se han mostrado más comúnmente implicados en interacciones de tipo no Watson-Crick se conocen como bucles de horquilla, protuberancias simétricas y asimétricas, pseudonudos y combinaciones innumerables 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, a menudo se prefiere que los procedimientos SELEX™ con segmentos aleatorios contiguos se inicien con secuencias de ácido nucleico que 50 contengan un segmento aleatorio de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 nucleótidos.

El método central SELEX™ ha sido modificado para lograr una serie de objetivos específicos. Por ejemplo, el documento US 5707796 describe el uso de SELEX™ junto con la electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas, tal como ADN plegado. El documento US 5763177 55 describe métodos basados en SELEX™ para seleccionar ligandos de ácido nucleico que contengan grupos fotorreactivos capaces de unirse y/o fotorreticularse y/o fotoactivarse una molécula objetivo. Los documentos US 5567588 y US 5861254 describen métodos basados en SELEX™ que logran una división altamente eficiente entre oligonucleótidos que tienen una afinidad alta y baja por una molécula objetivo. El documento US 5496938 describe métodos para obtener ligandos de ácido nucleico mejorados después de que se haya realizado el procedimiento 60 SELEX™. El documento US 5705337 describe métodos para unir covalentemente un ligando a su objetivo.

Counter-SELEX™ es un método para mejorar la especificidad de los ligandos de ácido nucleico con respecto a una

molécula objetivo eliminando las secuencias de ligando de ácido nucleico con reactividad cruzada con respecto a una o más moléculas no objetivo. Counter-SELEX™ comprende las etapas de: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto la mezcla candidata con el objetivo, donde los ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada con la diana con respecto a la mezcla candidata pueden dividirse del resto de la  
 5 mezcla candidata; (c) dividir los ácidos nucleicos de afinidad aumentada del resto de la mezcla candidata; (d) disociar el aumento de los ácidos nucleicos de afinidad del objetivo; (e) poner en contacto el aumento de los ácidos nucleicos con afinidad específica por la molécula o moléculas no objetivo, de tal forma que se eliminen los ligandos de ácido nucleico con afinidad específica por la molécula o moléculas no objetivo; y (f) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad específica solo a la molécula objetivo para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecidos para  
 10 secuencias de ácido nucleico con una afinidad y especificidad relativamente más altas para la unión a la molécula objetivo. Como se describe anteriormente para SELEX™, los ciclos de selección y amplificación se repiten según sea necesario hasta lograr el objetivo deseado.

En un ejemplo representativo, un aptámero de ARN se sintetiza en una columna de soporte sólido, usando técnicas convencionales tales como las descritas por Beaucage et al. (1981) *Tetrahedr. Letters* 22:1859-1862 y Sinha et al., (1984) *Nucleosides and Nucleotides* 3:157- 171. El grupo DMT final se elimina del aptámero de ARN resultante. Como alternativa, si se usa una síntesis a gran escala, el aptámero de ARN se puede hacer mediante la ampliación del método de soporte sólido o el aptámero de ARN se puede hacer mediante el uso de técnicas en fase de solución, particularmente si el producto final deseado es un oligonucleótido relativamente corto. Un material de  
 20 partida para el procedimiento de síntesis puede ser un oligoribonucleótido de ARN no tritilado en 5' o un análogo de la estructura primaria deseada, que preferiblemente puede tener bases protegidas, y que está preferiblemente unida a un soporte sólido. Se puede usar cualquier grupo protector usado convencionalmente. Típicamente, se utiliza N<sub>6</sub>-benzoílo para adenina, N<sub>4</sub>-benzoílo para citosina, N<sub>2</sub>-isobutiril para guanina y N<sub>2</sub>-benzoílo para 2-amino purina. Otros grupos protectores útiles incluyen fenoxiacetilo (PAC) y t-butoxiacetilo (TAC). Convenientemente, los grupos de  
 25 protección más lábiles de base deberían usarse para la síntesis del aptámero de ARN; los expertos en la técnica conocen estos grupos. Dichos grupos pueden ayudar a prevenir la hidrólisis de los tri o difosfatos generados, que generalmente son bastante estables en condiciones básicas, pero podrían estar sujetos a cierta hidrólisis. Otras modificaciones previstas se divulgan en la Patente de EE.UU N.º 6.011.020, e incluyen, pero sin limitación, la incorporación de moléculas que mejoran la biodisponibilidad, tales como PEG o colesterol a través de un enlace  
 30 covalente.

Además, pueden incorporarse durante la síntesis de ARN análogos nucleosídicos tales como 2'-desoxi, 2'-halo, 2'-amino (no sustituido o mono o disustituido), 2'-mono, di o trihalometilo, 2'-O-alquilo, alquilo 2'-O-halo-sustituido, 2'-alquilo, azido, fosforotioato, sulfhidrilo, metilfosfonato, fluoresceína, rodamina, pireno, biotina, xantina, hipoxantina,  
 35 2,6-diamino purina, 2-hidroxi-6-mercaptapurina y bases de pirimidina sustituidas en la posición 6 con azufre o la posición 5 con halo o grupos alquilo C<sub>1-5</sub>, enlazadores abásicos, 3'-desoxi-adenosina, así como otro "terminador de cadena" disponible o análogos "no extensibles" (en el extremo 3' del ARN), y similares. Además, asimismo pueden incorporarse diversas etiquetas, tales como <sup>32</sup>P o <sup>33</sup>P y similares, durante la síntesis, dando como resultado nuevos análogos de ARN producidos por este procedimiento. Otras modificaciones previstas se divulgan en la Patente de  
 40 EE.UU N.º 6.011.020, e incluyen, pero sin limitación, la incorporación de caperuzas 3', tales como una caperuza DT invertida, o una caperuza abásica invertida, o una combinación de las mismas.

#### Afinidad de unión de los aptámeros

45 La afinidad de unión describe la medida de la fuerza de la unión o afinidad de las moléculas entre sí. La afinidad de unión del aptámero en el presente documento con respecto a objetivos y otras moléculas se define en términos de K<sub>d</sub>. La constante de disociación puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica y puede calcularse incluso para mezclas complejas mediante métodos tales como los que se exponen, por ejemplo, en Caceci, M., et al., *Byte* (1984) 9:340-362. Ejemplos de medición de constantes de disociación se describen, por ejemplo, en el  
 50 documento US 7602495, que describe el análisis de resonancia de plasmón superficial, los documentos US 6562627, US 6562627, y US 2012/00445849. En otro ejemplo, la K<sub>d</sub> se establece utilizando un ensayo de unión a un filtro de nitrocelulosa de doble filtro como el divulgado por Wong y Lohman, (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5428- 5432.

55 Se ha observado, sin embargo, que para algunos oligonucleótidos pequeños, la determinación directa de K<sub>d</sub> es difícil y puede dar lugar a resultados engañosamente altos. En estas circunstancias, se puede realizar un ensayo de unión competitiva para la molécula objetivo u otra sustancia candidata con respecto a sustancias que se sabe que se unen al objetivo o al candidato. El valor de la concentración a la que se produce el 50 % de inhibición (K<sub>i</sub>) es, en condiciones ideales, equivalente a K<sub>d</sub>. Sin embargo, en ningún caso una K<sub>i</sub> será menor que K<sub>d</sub>. Por lo tanto, la  
 60 determinación de K<sub>i</sub>, en la alternativa, establece un valor máximo para el valor de K<sub>d</sub>. En estas circunstancias donde las dificultades técnicas impiden la medición precisa de K<sub>d</sub>, la medición de K<sub>i</sub> puede sustituirse convenientemente para proporcionar un límite superior para K<sub>d</sub>. También se puede utilizar un valor de K<sub>i</sub> para confirmar que un

aptámero de la presente se une a un objetivo.

#### Mejora de la estabilidad del aptámero

5 Un problema potencial encontrado en el uso de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos es que los oligonucleótidos en su forma fosfodiéster puede degradarse rápidamente en fluidos corporales por enzimas intracelulares y extracelulares tales como endonucleasas y exonucleasas antes de que se manifieste el efecto deseado. La presente divulgación también incluye análogos de ARN como se describe en el presente documento y/o modificaciones adicionales diseñadas para mejorar una o más características del aptámero de ARN, tal como la  
10 protección de la digestión por nucleasa.

Las modificaciones oligonucleotídicas contempladas en la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, aquellas que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, hidrofobicidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y fluxionalidad con respecto a las bases de ligando de ácido  
15 nucleico o con respecto al ligando de ácido nucleico en su conjunto.

Las modificaciones para generar oligonucleótidos que son resistentes a las nucleasas también pueden incluir uno o más enlaces internucleótidos sustitutos, azúcares alterados, bases alteradas, o combinaciones de los mismos. Dichas modificaciones incluyen modificaciones en el azúcar en la posición 2', modificaciones en la pirimidina en la  
20 posición 5, modificaciones en la purina en la posición 8, modificaciones en las aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo, modificaciones del esqueleto, modificaciones de fosforotioato o alquilfosfato, metilaciones y combinaciones inusuales de emparejamiento de bases, tales como las isobases isocitidina e isoguanosina; modificaciones en 3' y 5', tales como caperuzas; conjugación con un compuesto no inmunógeno de alto peso molecular; conjugación con un compuesto lipófilo; y modificación del esqueleto de fosfato.

25 En un ejemplo, el compuesto no inmunógeno de alto peso molecular conjugado con el aptámero de la presente divulgación es polialquilenglicol, preferiblemente polietilenglicol. En un ejemplo, la modificación del esqueleto comprende la incorporación de uno o más fosforotioatos en el esqueleto de fosfato. En otro ejemplo, el aptámero de la presente divulgación comprende la incorporación de menos de 10, menos de 6 o menos de 3 fosforotioatos en el  
30 esqueleto de fosfato.

#### Utilidad de los aptámeros

Las moléculas de aptámero de ARN de la presente divulgación se pueden usar como ligandos de afinidad para  
35 separar y purificar moléculas objetivo (por ejemplo, células madre cancerosas portadoras de CD133), como sondas para rastrear, controlar, detectar y cuantificar moléculas objetivo (por ejemplo, células madre cancerosas portadoras de CD133), o para bloquear, permitir, activar o catalizar reacciones que son fisiológicamente relevantes para lograr un efecto terapéutico. Pueden actuar como un agente farmacéutico, unirse a un objetivo específico y dirigir moléculas específicas a un sitio deseado.

40 Las moléculas de aptámero de ARN de la presente divulgación se pueden usar en procedimientos in vitro, por ejemplo, mezclas de purificación por afinidad para purificar moléculas objetivo (por ejemplo, células madre cancerosas portadoras de CD133). Los aptámeros son ideales para separaciones cromatográficas de moléculas objetivo (por ejemplo, células madre cancerosas portadoras de CD133) de contaminantes y para purificar moléculas  
45 objetivo de cultivos celulares o extractos celulares.

En un ejemplo, las moléculas de aptámero de ARN de la presente divulgación se pueden usar como un agente de captura para unir o inmovilizar un objetivo (por ejemplo, células madre cancerosas portadoras de CD133) a un soporte sólido. El soporte sólido puede estar compuesto por sustratos que tienen la estructura y la composición  
50 comúnmente asociadas con filtros, obleas, chips de obleas, membranas y películas finas. Sin embargo, se contempla que el soporte sólido puede estar compuesto por sustratos incluyendo, pero sin limitación, resinas, resinas de afinidad, perlas magnéticas o poliméricas, o cualquier reactivo de detección de diagnóstico, para capturar o inmovilizar reactivos para estudios de diagnóstico, detección o cuantitativos.

55 Los soportes sólidos pueden comprender cualquier material dependiendo del uso deseado, incluyendo, pero sin limitación, vidrio, superficies metálicas y materiales tales como acero, materiales cerámicos o polímeros tales como polietileno, polipropileno, poliamida y fluoruro de polivinilideno, etc., o combinaciones de los mismos.

#### Antígeno CD133

60 CD133, originalmente conocido como AC133 es una glucoproteína (también conocida como Prominina 1). Es un miembro de las glucoproteínas transmembrana pentaspan que se localizan específicamente en las protuberancias

celulares. CD133 se expresa en células madre hematopoyéticas, células progenitoras endoteliales, glioblastoma, células madre neuronales y gliales, tumores cerebrales pediátricos curados, así como riñón adulto, glándulas mamarias, tráquea, glándulas salivales, placenta, tracto digestivo, testículos y otros tipos de células.

#### 5 Aislamiento y purificación de células madre cancerosas que expresan CD133

El mejor ejemplo conocido de renovación de células adultas mediante la diferenciación de células madre es el sistema hematopoyético. Los precursores inmaduros en el desarrollo, tales como las células madre hematopoyéticas y las células progenitoras, responden a las señales moleculares para formar gradualmente los variados tipos de células sanguíneas y linfoides. Las células madre también se encuentran en otros tejidos, incluidos los tejidos epiteliales y los tejidos mesenquimales. Las células madre cancerosas pueden surgir de cualquiera de estos tipos de células, por ejemplo, como resultado del daño genético en las células madre normales o por la proliferación desregulada de células madre y/o células diferenciadas.

15 Las células madre cancerosas pueden derivarse de cualquier cáncer que comprenda células madre tumorigénicas, es decir, células que tengan capacidad de proliferar de forma extensa o indefinida, y que den lugar a la mayoría de las células cancerosas. Dentro de un tumor establecido, la mayoría de las células han perdido la capacidad de proliferar ampliamente y formar nuevos tumores, y un pequeño subconjunto de células madre cancerosas proliferan para regenerar de este modo las células madre cancerosas, así como dar lugar a células tumorales que carecen de potencial tumorigénico. Las células madre cancerosas pueden dividirse de forma asimétrica y simétrica y pueden mostrar tasas variables de proliferación. Las células madre cancerosas pueden incluir células amplificadoras de tránsito o células progenitoras que han adquirido propiedades de las células madre.

Los cánceres representativos a partir de los cuales se pueden aislar las células madre incluyen cánceres caracterizados por tumores sólidos, incluyendo, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfagiosarcoma, sinovioma, linfagioendoteliosarcoma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudorosas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello del útero, tumor de testículos, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma de epitelio, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependioma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

Los cánceres representativos adicionales de los cuales las células madres se pueden aislar o enriquecer según la presente divulgación incluyen neoplasias hematopoyéticas, tales como linfomas de linfocitos B y leucemias, incluyendo linfoma no Hodgkin de bajo grado/folicular (NHL), NHL linfocítico pequeño (SL), NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL de células pequeñas no escindidas de alto grado, NHL de enfermedad voluminosa, y macroglobulinemia de Waldenstrom, leucemia leucocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia monocítica, leucemia mielógena y leucemia promielocítica.

45 Las células madre cancerosas portadoras de CD133 se pueden seleccionar utilizando moléculas de aptámeros como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los aptámeros que se acoplan a los tintes fluorescentes se pueden utilizar para la selección positiva de células madre cancerosas. Se sabe que CD133 también se expresa en algunas de células normales. Sin embargo, se cree que la expresión de CD133 se regula positivamente en las células madre cancerosas. Los marcadores de células madre cancerosas se expresan típicamente en un nivel que es al menos aproximadamente 5 veces mayor que las células diferenciadas del mismo origen o células no tumorigénicas, por ejemplo, al menos aproximadamente 10 veces mayor, o al menos aproximadamente 15 veces mayor, o al menos aproximadamente 20 veces mayor, o al menos aproximadamente 50 veces mayor, o al menos aproximadamente 100 veces mayor. El procedimiento de selección también puede incluir marcadores de selección negativos que se pueden utilizar para la eliminación de estas células cancerosas en la población que no son células madre cancerosas.

Se entenderá que al realizar la presente divulgación, la separación de células portadoras de CD133 se puede realizar mediante varios métodos diferentes. Por ejemplo, el aptámero de ARN de la presente divulgación puede unirse a un soporte sólido para permitir una separación en bruto. Se pueden emplear diversas técnicas de diferente eficacia dependiendo de la eficiencia de la separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y la velocidad de rendimiento y la necesidad de equipos sofisticados y/o habilidades técnicas. Los procedimientos para el aislamiento o la purificación pueden incluir, pero sin limitación, separación magnética utilizando perlas magnéticas recubiertas

con aptámero, cromatografía de afinidad e “inmunoprecipitación” con aptámero unido a una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan aislamiento o purificación precisa incluyen, pero sin limitación, FACS. Los métodos para preparar FACS serán evidentes para el experto en la técnica.

#### 5 Enriquecimiento de células madre cancerosas que expresan CD133

En un ejemplo, las moléculas de aptámero de ARN de la presente divulgación se enriquecen a partir de una muestra biológica obtenida de un sujeto. Típicamente, el sujeto será uno que tenga un tumor o se sospeche que tiene un tumor que contiene células madre cancerosas. El término “enriquecido” o “enriquecimiento”, o variaciones de los mismos, se usan en el presente documento para describir una población de células donde la proporción de un tipo de célula particular (es decir, células madre cancerosas) aumenta cuando se compara con una población de células no tratada (por ejemplo, células en la muestra).

En un ejemplo, una población enriquecida por células madre cancerosas comprende al menos aproximadamente el 0,1 %, o el 0,5 % o el 1 % o el 2 % o el 5 % o el 10 % o el 15 % o el 20 % o el 25 % o el 30 % o el 50 % o el 75 % de células madre portadoras de CD133. A este respecto, se adoptará el término “población celular enriquecida que comprende células madre cancerosas” para proporcionar un soporte explícito para el término “población de células que comprende un X % de células madre cancerosas, donde X % es un porcentaje como se menciona en el presente documento.

En un ejemplo, la población de células se enriquece a partir de una preparación celular que comprende células CD133+ en una forma seleccionable. A este respecto, se entenderá que el término “forma seleccionable” significa que las células expresan un marcador (por ejemplo, un marcador de superficie celular) que permite la selección de células portadoras de CD133.

#### Diagnóstico de cáncer utilizando moléculas de aptámero

Las moléculas de aptámero de ARN de la presente divulgación se pueden usar in vitro con fines de diagnóstico para determinar la presencia de células madre de cáncer en tejido neoplásico. El método implica examinar una muestra biológica para detectar la presencia de células madre cancerosas CD133+. Por ejemplo, la muestra biológica puede ponerse en contacto con un aptámero de ARN marcado de la presente divulgación y se determina la capacidad del aptámero de ARN para unirse específicamente a las células en la muestra. La unión indica la presencia de una célula madre cancerosa portadora de CD133. El aptámero de ARN de la presente divulgación también se puede usar para localizar un tumor in vivo administrando a un sujeto un aptámero de ARN aislado de la presente divulgación que está marcado con un grupo indicador que proporciona una señal detectable. Los aptámeros unidos pueden detectarse entonces mediante citometría de flujo, microscopía, escintigrafía externa, tomografía por emisión, imágenes ópticas o exploración radionuclear. El método puede usarse para clasificar un cáncer en un sujeto con respecto a la extensión de la enfermedad y para controlar los cambios en respuesta a la terapia.

La detección de células madre cancerosas se puede facilitar mediante el acoplamiento del aptámero de ARN a un marcador detectable. Los ejemplos de etiquetas detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, etiquetas densas en electrones, etiquetas para IRM y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o acetilcolinesterasa. Los ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelifona, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de disclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol. Los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina, y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{82}\text{Rb}$  o  $^3\text{H}$ .

La marcación en el extremo 3' del aptámero se puede lograr, por ejemplo, mediante extensión con plantilla utilizando polimerasa Klenow, mediante ligadura mediada por ARN ligasa T4 y mediante la desoxinucleotidil transferasa terminal. El etiquetado en el extremo 5' se puede lograr mediante la complementación de la mezcla de transcripción in vitro con un exceso de GTP- $\beta$ -S, cuyo tiol se puede usar para unir biotina. Además, se puede usar la conjugación química directa de uno o varios grupos adecuados para los extremos 5' o 3' para marcar los aptámeros.

#### Agente anticanceroso de la presente divulgación

Las moléculas de aptámero de ARN de la presente divulgación pueden conjugarse con un resto y usarse para dirigir el resto a células CD133+, preferiblemente células madre cancerosas. Los ejemplos de restos incluyen toxinas, radionúclidos o agentes quimioterapéuticos que pueden usarse para destruir células madre cancerosas.

El aptámero de ARN se puede fusionar al resto, por ejemplo, la toxina, ya sea en virtud del resto y el aptámero que se sintetizan químicamente, o por medio de conjugación, por ejemplo, un enlace covalente no peptídico, por ejemplo, un enlace no amida, que se utiliza para unir el aptámero de ARN producido por separado y el resto. Como alternativa, el aptámero de ARN y el resto pueden unirse en virtud de un péptido enlazador adecuado.

5 Las moléculas de toxina útiles incluyen toxinas peptídicas, que son significativamente citotóxicas cuando están presentes intracelularmente. Los ejemplos de toxinas incluyen citotoxinas, disruptores metabólicos (inhibidores y activadores) que alteran la actividad enzimática y, por lo tanto, destruyen las células madre cancerosas y las moléculas radiactivas que destruyen todas las células dentro de un radio definido de la porción efectora. Un  
10 disruptor metabólico es una molécula, por ejemplo, una enzima o una citocina que cambia el metabolismo de una célula de tal manera que su función normal se altere. En términos generales, el término toxina incluye cualquier efector que causa la muerte de una célula tumoral.

Muchas toxinas peptídicas tienen un dominio de unión al receptor eucariota generalizado; en estos casos, la toxina  
15 debe modificarse para evitar la destrucción de las células no portadoras de CD133 (por ejemplo, para evitar la destrucción de las células no portadoras CD133 pero que tengan un receptor para la toxina no modificada). Dichas modificaciones deben realizarse de una manera que conserve la función citotóxica de la molécula. Las toxinas potencialmente útiles incluyen, pero sin limitación, toxina de la difteria, toxina del cólera, ricino, toxina 0-Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina del tétanos, exotoxina de *Pseudomonas*,  
20 alorina, saponina, modeccina y gelanina. Otras toxinas incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y la linfotóxina (LT). Otra toxina que tiene actividad antitumoral es la caliqueamicina gamma 1, un antibiótico antitumoral que contiene diino-eno con una potencia considerable contra los tumores (Zein N et al (1988). *Science* 240:1198-201).

25 Como ejemplo, la toxina de la difteria (cuya secuencia se conoce) puede conjugarse con las moléculas de aptámero de ARN de la presente divulgación. La molécula de toxina diftérica natural secretada por *Corynebacterium diphtheriae* consiste en varios dominios funcionales que pueden caracterizarse, comenzando en el extremo amino terminal de la molécula, como el fragmento A enzimáticamente activo (AA 1-193) y el fragmento B (AA 194-535) que incluye un dominio de translocación y un dominio de unión a células generalizado (AA 475-535).

30 El aptámero de ARN y el resto de toxina se pueden enlazar de cualquiera de las varias formas que se conocerán por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un método para conjugar un aptámero de ARN con una toxina (gelonina) se describe en Chu TC et al. (2006) *Cancer Res* 6(12):5989-5992.

35 El resto también puede ser un modulador del sistema inmunológico que activa o inhibe el sistema inmunológico del cuerpo a nivel local. Por ejemplo, las citocinas, por ejemplo, linfocinas, tales como IL-2, que se administran a un tumor, pueden causar la proliferación de linfocitos T citotóxicos o células asesinas naturales en las proximidades del tumor.

40 El resto o grupo indicador también puede ser una molécula radiactiva, por ejemplo, un radionucleótido, o un llamado sensibilizador, por ejemplo, una molécula precursora que se vuelve radiactiva en condiciones específicas, por ejemplo, el boro cuando se expone a un haz de neutrones de baja energía, en la llamada "terapia de captura de neutrones de boro" (BNCT), como se describe en Barth et al. (1990). *Scientific American* Oct 1990:100-107. Los compuestos con dichas porciones efectoras radiactivas pueden usarse tanto para inhibir la proliferación de células  
45 madre cancerosas en el tumor como para marcar las células madre cancerosas con fines de obtención de imágenes.

Los radionucleótidos son moléculas radioactivas de un solo átomo que pueden emitir partículas  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ . Los emisores de partículas alfa son preferidos a los emisores de partículas  $\beta$  o  $\gamma$ , ya que liberan emisiones de energía mucho más altas en una distancia más corta y, por lo tanto, son eficientes sin penetrar significativamente y dañar los  
50 tejidos normales. Los radionucleidos emisores de partículas  $\alpha$  adecuados incluyen  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ , y  $^{212}\text{Bi}$ .

La molécula radioactiva debe estar estrechamente unida al aptámero directamente o por un quelato bifuncional. Este quelato no debe permitir la elución y, por lo tanto, la liberación prematura de la molécula radiactiva in vivo. Waldmann, *Science*, 252:1657-62 (1991). Como ejemplo, para adaptar la BNCT a la presente invención, se puede  
55 seleccionar un isótopo estable de boro, por ejemplo, boro 10, como el resto antitumoral o porción efectora del compuesto. El boro se enviará y se concentrará en o sobre las células tumorales mediante la unión específica del aptámero a la célula madre cancerosa. Después de un tiempo que permite que se acumule una cantidad suficiente de boro, se pueden obtener imágenes del tumor e irradiarlo con un haz de neutrones de baja energía, con una energía de aproximadamente 0,025 eV. Si bien esta irradiación de neutrones, por sí misma, causa poco daño al  
60 tejido sano que rodea el tumor o al propio tumor, el boro 10 (por ejemplo, en la superficie de una célula tumoral) capturará los neutrones, formando de este modo un isótopo inestable, el boro 11. El boro 11 se fisiona instantáneamente produciendo 7 núcleos de litio y partículas energéticas  $\alpha$ , aproximadamente 2,79 millones de Ev.

Estas partículas pesadas son una forma de radiación altamente mortal, pero muy localizada, ya que las partículas tienen una longitud de trayectoria de solo aproximadamente un diámetro celular (10 micrómetros).

#### Agente de administración de la presente divulgación

5 Las moléculas de aptámero de ARN de la presente divulgación se pueden usar para la administración de ARNsi o ribozima en células. Los ejemplos de ARNsi o ribozima adecuados dependerán de las circunstancias. Los ejemplos de ARNsi o ribozimas que son adecuados para su uso según la presente divulgación incluyen aquellos que se dirigen a los transportadores de membrana de casete de unión a ATP, genes no troncales (Bmi-1, Notch 1, Sox 2,  
10 Oct-4, Nanog,  $\beta$ -catenina, Smo, nestina, ABCG2, Wnt2 y SCF, etc.), GAPDH (3-fosfato de gliceraldehído deshidrogenasa) y survivina.

A modo de ejemplo, esto se ha demostrado en la técnica anterior usando un aptámero anti-PSMA. Basado en el conocimiento de que la PSMA se internaliza a través de los hoyos recubiertos de clatrina al endosoma, se postuló  
15 que el aptámero anti-PSMA transportaría el ARNsi unido a las células que expresan PSMA, y el aptámero-ARNsi unido a la proteína PSMA obtendría acceso a la célula a través de la internalización. A continuación, la porción de ARNsi se sometería a un procesamiento por parte del complejo Dicer y se incorporaría a la vía de silenciamiento génico mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Tres grupos han utilizado diferentes estrategias para lograr esto. Chu et al (2006) Nucleic Acids Res 34, e73 describen un método de conjugación  
20 mediada por el puente de biotina-estreptavidina para ensamblar el aptámero anti-PSMA y el ARNsi. McNamara et al. (2006) Nat Biotechnol 24, 1005-1015 usaron un enfoque de quimérica aptámero de "ARN solamente"-ARNsi para unir el aptámero al ARNsi. En un estudio posterior de Wullner et al (2008). Curr. Cancer Drug Targets 8:554-565, los autores utilizaron el aptámero anti-PSMA para administrar el ARNsi del factor 2 de alargamiento eucariótico (EEF2) a células de cáncer de próstata PSMA positivas, se utilizaron aptámeros bivalentes de PSMA para este fin. Los  
25 autores demostraron que, en comparación con la quimera anti-PSMA-ARNsi monovalente, la potencia de desactivación génica de la construcción de aptámero bivalente fue superior.

Las moléculas de aptámero de ARN de la presente divulgación también se pueden usar para administración carga en células madre cancerosas CD133<sup>+</sup> en una diversidad de tumores sólidos. La gelonina es una toxina ribosómica  
30 que puede inhibir el procedimiento de síntesis de proteínas y es citotóxica. Sin embargo, es impermeable a la membrana y necesita un posicionador para su entrada celular. Por lo tanto, las moléculas de aptámero de ARN de la presente divulgación pueden utilizarse para administrar una carga útil tóxica impermeable a la membrana a las células madre cancerosas.

35 La resistencia tumoral a los agentes quimioterapéuticos citotóxicos se debe en parte a la administración insuficiente a y la captación, y más importante, al flujo de salida por las células cancerosas. Las nanopartículas biodegradables (NP) derivadas de poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) PLGA se utilizaron para abordar este problema como se describe en Dhar et al (2008) Proc Natl. Acad. Sci. USA 105:17356-17361. En resumen, el cisplatino se convirtió en su profármaco, compuesto de Pt (IV), mediante la introducción de dos cadenas de alquilo. Esto aumentó la  
40 hidrofobicidad del compuesto y facilitó el procedimiento de su empaquetamiento dentro del núcleo hidrófobo de la NP. Se utilizó polietilenglicol (PEG) como copolímero durante la etapa de nanoprecipitación para sintetizar la nanopartícula de PLGA-PEG. La superficie de PLGA-PEG-NP se decoró con un aptámero PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata). La NP se sometió a endocitosis cuando se incubó con células LNCaP, y el profármaco alquilado se convirtió en cisplatino mediante el procedimiento de reducción citosólica.

45 La presente divulgación también se extiende al uso de las moléculas de aptámero de ARN como agentes simultáneos de administración de fármacos y de obtención de imágenes. Esto se puede lograr conjugando el aptámero con la superficie de un punto cuántico fluorescente (QD). A continuación, el conjugado QD-aptámero se incubó con Dox para formar la nanopartícula QD-aptámero-Dox. Tanto Dox como QD son moléculas fluorescentes.  
50 Sin embargo, debido a su proximidad en la nanopartícula QD-aptámero-Dox, inactivan entre sí la fluorescencia mediante un mecanismo de transferencia de energía de resonancia bi-fluorescente (FRET). Por lo tanto, la nanopartícula QD-aptámero-Dox no es fluorescente. Sin embargo, la internalización de la nanopartícula QD-aptámero-Dox a través de la endocitosis mediada por PSMA en células de cáncer de próstata provoca la liberación de Dox de las nanopartículas QD-aptámero-Dox, lo que da como resultado la recuperación de la fluorescencia tanto  
55 de Dox como de QD.

#### Composiciones farmacéuticas

En un ejemplo de la presente divulgación, el aptámero de ARN, el agente anticanceroso o el agente de  
60 administración de fármacos según la presente divulgación se administra en forma de una composición que comprende un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. La elección del excipiente u otros elementos de la composición se puede adaptar según la ruta y el dispositivo utilizado para la administración.

Los términos “portador” y “excipiente” se refieren a composiciones de materia que se usan convencionalmente en la técnica para facilitar el almacenamiento, la administración y/o la actividad biológica de un compuesto activo (véase, por ejemplo, Remington’s Pharmaceutical Sciences, 16<sup>a</sup> Ed., Mac Publishing Company (1980)). Un vehículo también puede reducir cualquier efecto secundario no deseado del compuesto activo. Un vehículo adecuado es, por ejemplo, estable, por ejemplo, incapaz de reaccionar con otros ingredientes en el vehículo. En un ejemplo, el vehículo no produce un efecto adverso local o sistémico significativo en los receptores a las dosis y concentraciones empleadas para el tratamiento.

10 Los vehículos adecuados para la presente divulgación incluyen los usados convencionalmente, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, solución de Ringer, una solución tamponada, hialuronano y glicoles son vehículos líquidos ejemplares, particularmente (cuando son isotónicos) para las soluciones. Los vehículos y excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, celulosa, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, 15 glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares.

Se pueden añadir otros aditivos generales tales como agente antioxidante, solución tampón, agente bacteriostático, etc. Para preparar soluciones inyectables, se pueden añadir adicionalmente píldoras, cápsulas, gránulos o comprimidos, diluyentes, agentes dispersantes, tensioactivos, aglutinantes y lubricantes.

20 El agente anticanceroso o el agente de administración de fármacos que contiene el aptámero de ARN de la presente invención se puede administrar por vía parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, hipodérmica, local o peritoneal). La dosis eficaz del agente anticanceroso se puede determinar según el peso, la edad, el sexo, el estado de salud, la dieta, la frecuencia de administración, el método de administración, la excreción y la gravedad de una 25 enfermedad. En un ejemplo, el agente anticanceroso o el agente de administración de fármacos contiene el aptámero de ARN en un 10-95 % en peso. En otro ejemplo, el agente anticanceroso o el agente de administración del fármaco contiene el aptámero de ARN en un 25-75 % en peso.

La frecuencia de administración puede ser de una a varias veces al día.

30 En un ejemplo, el contenido intracelular eficaz del aptámero de ARN es de aproximadamente 1 nM a 1000 nM. En otro ejemplo, el contenido intracelular eficaz del aptámero de ARN es preferiblemente de 100 nM a 500 nM. Sin embargo, la dosis del aptámero podría ser inferior o superior al rango anterior.

### 35 Combinaciones de aptámeros

La molécula o moléculas de aptámero de ARN aisladas de la presente divulgación se pueden usar en solitario o en combinación con uno o más aptámeros de ARN adicionales según cualquier método divulgado en el presente documento. En un ejemplo, la molécula o moléculas de aptámero de ARN de la presente divulgación se pueden 40 combinar con un aptámero de ARN que facilita la detección, purificación o enriquecimiento de células madre cancerosas. En un ejemplo, el aptámero de ARN adicional comprende la secuencia del aptámero EpDT3 5’ - GCGACUGGUUACCCGGUCG- 3’ como se describe en Shigdar S et al (2011). Cancer Sci 102(5):991-998. En otro ejemplo, el aptámero de ARN adicional comprende la secuencia 5’ -ACGUAUCCCUUUUCGCGUA- 3’.

### 45 Kits

La presente divulgación también proporciona kits de diagnóstico para realizar los métodos divulgados en el presente documento. En un ejemplo, el kit de diagnóstico incluye el aptámero de ARN o el agente de diagnóstico tal como se describe en el presente documento para detectar células que expresan CD133 (por ejemplo, células madre 50 cancerosas).

El kit también puede incluir agentes auxiliares tales como agentes de tamponamiento y agentes estabilizantes. El kit de diagnóstico puede incluir además agentes para reducir la interferencia de fondo, reactivos de control y un aparato para realizar una prueba. Generalmente también se incluyen instrucciones sobre cómo usar el kit de diagnóstico.

### 55 **Ejemplos**

#### Procedimientos

### 60 **Líneas celulares y cultivo celular**

Las líneas celulares de origen humano utilizadas en este estudio se adquirieron en la Colección Americana de

Cultivos Tipo. Son células de cáncer colorrectal humano HT-29; células de carcinoma hepatocelular humano Hep3B; células de carcinoma de glioblastoma multiforme humano T98G; y las células de riñón embrionario humano HEK293T. Las células se cultivaron y se mantuvieron en cultivo con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Victoria, Australia) complementado con suero fetal de ternera al 10 % (HEK293T, HT-29) o medio esencial mínimo (MEM) (Invitrogen) complementado con suero fetal de ternera al 10 % (Hep3B, T98G). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %.

#### Expresión de proteínas y SELEX celular.

- 10 El ADNc de CD133 humano se adquirió de Invitrogen y se clonó en un vector de expresión de mamífero, pcDNA 3.1/V5-His-TOPO. El CD133 recombinante etiquetado con histina 6x se expresó de forma transitoria en células HEK293T. Brevemente, las células HEK293T se sembraron en placas de 100 mm o 60 mm para alcanzar una confluencia del 70 % después de 24 horas de incubación, y se transfectaron con un total de 24 u 8 ug, respectivamente, de CD133 usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies) medio sin antibióticos según las instrucciones del fabricante. Después de una incubación de 72 horas, las células transfectadas se utilizaron como objetivo para la SELEX celular.

#### Selección de SELEX.

- 20 Se sintetizó (GeneWorks, Australia) una biblioteca de ADN que contenía una secuencia aleatoria central de 40 nt (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC AAG AAT AAA CGC TCA A-N40- TTC GAC AGG CTC ACA ACA GGC, con la secuencia subrayada del promotor de la ARN polimerasa T7). El agrupamiento de ADN bicatenario se generó a partir de la biblioteca sintética original mediante una PCR a gran escala utilizando cebadores que flanqueaban la secuencia aleatoria, 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC AAG AAT AAA CGC TCA A -3' y 5'- GCC TGT  
25 GAG CCT CCT GTC GAA -3'. Una porción de los productos de PCR a gran escala (~10<sup>14</sup> secuencias) se usó como plantilla para la transcripción in vitro para producir el agrupamiento de ARN modificado con 2'-fluoropirimidina inicial usando un kit de transcripción Durascribe® T7 (EPICENTRE® Biotechnologies, EE.UU.). Para SELEX, el ARN, a una concentración de 5 µM para la selección inicial o 1 µM para cada ronda iterativa, se diluyó en 100 µl de tampón de unión (solución salina tamponada de fosfato de Dulbecco que contenía MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 0,1 mg/ml de ARNt y 0,1  
30 mg/ml de esperma de salmón) y se desnaturalizó a 85 °C durante 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se hibridó a 37 °C durante 15 min, antes de incubar con la proteína objetivo expresada en células HEK293T durante 1 hora a 4 °C. Después de la incubación y los lavados extensos, el ARN unido se transcribió de manera inversa utilizando la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen), seguido de la amplificación por PCR y la transcripción in vitro y se usó para la siguiente ronda de SELEX. Se incluyeron etapas de  
35 contraselección a partir de la ronda 4, utilizando una proteína irrelevante marcada con His expresada en células HEK293T, para disminuir el enriquecimiento de especies que reconocen específicamente la etiqueta His, las células HEK293T o la placa de cultivo tisular. El número de ciclos de amplificación de PCR también se optimizó para evitar la sobre-amplificación de productos de PCR "parásitos" no específicos. Además, la rigurosidad del procedimiento de selección se mejoró para promover la selección de aptámeros de alta afinidad a través de ajustes a la concentración  
40 de aptámero, los tiempos de incubación y el número de lavados. Para adquirir aptámeros de alta especificidad, el número de células utilizadas se redujo progresivamente, mientras que la rigurosidad del lavado aumentó durante la progresión de SELEX, con selecciones negativas incluidas en la cuarta ronda. El enriquecimiento se controló utilizando el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP) y la citometría de flujo utilizando células  
45 vivas.

#### Análisis RFLP.

- El enriquecimiento de los aptámeros candidatos durante la selección se determinó mediante un polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP). Brevemente, el RFLP se realizó como se describe previamente (Das *et al.* 2009; Missailidis & Hardy 2009), con modificaciones menores. Aproximadamente 5 ng de ADNc de ciclos iterativos se amplificaron por PCR durante ocho ciclos. El ADN amplificado se digirió con 4 enzimas de restricción, *Afa* I, *Alu* I, *Hha* I y *Xsp* I que reconocen 4 nucleótidos (cortadores frecuentes) en el tampón T suministrado por el fabricante (Takara) con albúmina de suero bovino al 0,1 % (p/v) a 37 °C durante una noche. Después de la digestión durante una noche, el ADN se calentó a 65 °C, se enfrió en hielo y se separó mediante electroforesis en un gel  
55 nativo de poliacrilamida al 20 % en tampón TBE. Después, el gel se tñó en GelStar y se visualizó utilizando un sistema de imágenes de gel estándar.

#### Ensayos de citometría de flujo.

- 60 Las células se recogieron a una confluencia del 80 % con digestión con tripsina y se resuspendieron en tampón de lavado (DPBS con MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM) y se enumeraron. Después de la centrifugación (1000 x g durante 5 min), el sedimento celular se resuspendió en tampón de unión (DPBS complementado con MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 0,1 mg/ml de ARNt,

0,1 mg/ml de ADN de esperma de salmón) y se diluyó a  $1 \times 10^6$ /ml.

Para confirmar la unión del aptámero a la proteína objetivo, el ARN de las rondas iterativas se marcó en los extremos 3' con isotiocianato de fluoresceína (FITC) según un método descrito previamente (Willkomm & Hartmann (2005). Weinheim, Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA 1:86-94). Se utilizaron todo el tiempo tubos de ámbar para minimizar el fotoblanqueo. Brevemente, las muestras se oxidaron con peryodato de sodio. La oxidación se terminó con la adición de etilenglicol 10 mM, seguido de precipitación con etanol. Se añadió FITC en un exceso de 30 molar, y la reacción se completó durante una noche a 4 °C. Se incubó un  $\mu$ M de ARN marcado con FITC con  $5 \times 10^5$  HEK293T tripsinizadas transfectadas con proteína CD133 o células HEK293T no transfectadas en 100  $\mu$ l de tampón de unión durante 1 h sobre hielo, seguido de lavado tres veces y resuspensión en 300  $\mu$ l de tampón de unión. La intensidad de la fluorescencia se determinó con un citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson) contando 50.000 eventos en cada muestra. El ARN marcado con FITC de la biblioteca no seleccionada se usó para determinar la unión no específica.

15 La unión para cada ronda se calculó después de restar la intensidad de fluorescencia media de la unión del ARN de la ronda cero a las células objetivo, así como la de la unión a las células de control negativo según un método descrito por Ellington y colegas (Li *et al.* (2009). J. Proteome Res 8:2438-48).

#### Clonación, secuenciación y análisis estructural de aptámeros seleccionados.

20 Después de los análisis de RFLP y citometría de flujo de las rondas iterativas, la ronda seis demostró un enriquecimiento suficiente de las secuencias de ARN que reconocieron selectivamente la proteína objetivo. Este agrupamiento enriquecido se amplificó por PCR durante diez ciclos y los productos de la PCR se clonaron en el plásmido pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen). Se preparó ADN plasmídico de clones individuales y se determinó su secuencia utilizando un procedimiento automatizado de secuenciación de ADN. Las secuencias de aptámeros se analizaron utilizando ClustalX2 (Larkin *et al.* (2007) Bioinformatics 23:2947-8). Las estructuras secundarias se predijeron utilizando el programa RNAfold (Hofacker (2003) Nucleic Acids Res 31:3429-31).

#### Determinación de la afinidad de aptámero.

30 La constante de disociación ( $K_d$ ) de la exitosa especie de aptámero de ARN de 2'-fluoropirimidina con respecto a CD133 nativo expresado en la superficie celular se determinó mediante citometría de flujo. Las células HEK293T transfectadas con proteína CD133, o las células HEK293T no transfectadas ( $5 \times 10^5$ ) se incubaron primero con tampón de bloqueo (tampón de unión que contenía azida sódica al 0,2 % (p/v)) seguida de dos lavados con tampón de unión antes de la incubación con concentraciones en serie (aproximadamente 10 veces por encima y por debajo de la  $K_d$  aparente) de aptámero marcado con FITC en un volumen de 100  $\mu$ l de tampón de unión durante 1 h en hielo. Las células se lavaron tres veces con tampón de unión, se resuspendieron en 150  $\mu$ l de tampón de unión y se sometieron a análisis de citometría de flujo. La biblioteca no seleccionada marcada con FITC se utilizó como control negativo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de la biblioteca no seleccionada se restó de la de la célula de aptámero-objetivo para generar el MFI de unión específica. La  $K_d$  para cada aptámero se determinó mediante análisis de Scatchard según la ecuación:

$$[\text{Aptámero unido}]/[\text{aptámero}] = -(1/K_d) \times [\text{aptámero unido}] + ([T]_{\text{tot}}/K_d)$$

45 donde  $[T]_{\text{tot}}$ , representa la concentración objetivo total.

#### Truncamiento de aptámeros y determinación de la especificidad.

Para generar los aptámeros truncados, se sintetizaron los oligonucleótidos de ADN sentido y antisentido de las secuencias deseadas. CD133-1-1 (1<sup>er</sup> truncamiento) se derivó de un oligonucleótido sentido, 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGA CAA GAA TAA ACG CTC AAC CCA CCC TCC TAC ATA GGG AGG AAC GAG TTA CTA TAG -3', y oligonucleótido antisentido, 5'- CTA TAG TAA CTC GTT CCT CCC TAT GTA GGA GGG TGG GTT GAG CGT TTA TTC TTG TCT C -3'; CD133-1-2 (2<sup>o</sup> truncamiento) se derivó de un oligonucleótido sentido: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CTC AAC CCA CCC TCC TAC ATA GGG AGG AAC GAG T-3' y un oligonucleótido antisentido, 5'- ACT CGT TCC TCC CTA TGT AGG GTG GGT TGA GC -3'; CD133-1-2-1 (3<sup>er</sup> truncamiento) se derivó de un oligonucleótido sentido, 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAC CAC CCT ACA TAG GGT GG-3' y un oligonucleótido antisentido, 5'- CCA CCC TAT GTA GGA GGG TGG-3'; y CD133-1-2-2 (4<sup>o</sup> truncamiento) se derivó de un oligonucleótido sentido, TAA TAC GAC TCA CTA TAC CCT ACA TAG GG-3' y un oligonucleótido antisentido, 5'- CCC TAT GTA GGA GGG-3'. CD133-2-1 (1<sup>er</sup> truncamiento) se derivó de un oligonucleótido sentido 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAC AGA ACG TAT ACT ATT CTG-3' y un oligonucleótido antisentido, 5'-CAG AAT AGT ATA CGT TCT G-3' (la secuencia promotora de ARN T7 está subrayada). Los pares relevantes de oligonucleótidos se mezclaron en relaciones molares iguales en 1 x tampón PEI (Tris-HCl 0,1 M, pH 8, MgCl<sub>2</sub> 0,1 M NaCl 0,5 M y

ditiotreitil 0,1 M), se calentaron durante 5 min a 90 °C y se enfriaron lentamente a temperatura ambiente antes de la precipitación con etanol. La transcripción in vitro y el marcado con FITC se realizaron como se describe anteriormente. Los truncamientos finales de estos clones (CD133-1-4 y CD133-2-1), 5'-DY647-CCC TCC TAC ATA GGGdT-3' y 5'-DY647- CAG AAC GTA TAC TAT TCT GdT-3', también se sintetizaron químicamente con una etiqueta fluorescente 5'-DY647 y una desoxitimidina 3'-invertida (Dharmacon). Las afinidades de unión de estos dos aptámeros y un control negativo de aptámero se determinaron utilizando líneas celulares CD133 positivas (HT-29 y Hep3B) y CD133 negativas (T98G y HEK293T). La etapa de bloqueo se realizó a 4 °C utilizando un tampón de bloqueo que contenía suero de ternera fetal al 5 % (v/v), mientras que la unión de los aptámeros se realizó a 37 °C durante 30 min.

10

#### **Microscopia confocal.**

Veinticuatro horas antes del etiquetado, las células se sembraron en una densidad de 75.000 células por cm<sup>2</sup> en un portaobjetos de 8 cámaras de fondo de vidrio (Lab-Tek II, Nunc). DY647-CD133-1-2-2, DY647-CD133-2-1 y el aptámero de control se prepararon de la misma manera que para la citometría de flujo. Después de la eliminación del medio, las células se incubaron en tampón de bloqueo que contenía suero al 5 % (v/v) a 37 °C durante 15 min, se lavaron dos veces en tampón de unión antes de la incubación con aptámero 200 nM durante 30 min a 37 °C. Se añadió bisbencimida Hoechst 33342 (3 µg/ml) (Sigma) a las células durante los últimos 15 min de incubación. La solución de aptámero se eliminó y las células se lavaron 3 veces durante 5 min cada una en tampón de unión antes de la visualización utilizando un microscopio confocal de barrido láser FluoView FV10i (Olympus).

#### **Inhibición de la endocitosis.**

Esto se realizó esencialmente como se describe para microscopía confocal con modificaciones menores. Brevemente, las células se trataron previamente con un agotado en potasio (Hepes 50 mM, NaCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM) o un tampón hipertónico (tampón con agotamiento de potasio que contenía KCl 3 mM y sacarosa 450 mM) durante 1 h a 37 °C. Estos tampones también se usaron en la etapa de incubación con aptámeros y todas las etapas de aclarado. La eficacia de estos tratamientos para inhibir la endocitosis se verificó mediante la caracterización cualitativa de la internalización de la transferrina humana conjugada con Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Se añadió transferrina (5 µg/ml) a las células después del pretratamiento seguido de una incubación de 30 min a 37 °C. Las células se lavaron tres veces en sus respectivos tampones y se visualizaron utilizando el microscopio confocal FluoView FV10i.

#### **Colocalización de aptámeros con transferrina.**

Las células HT-29, Hep3B, T98G y 293T se prepararon como se describe previamente para la microscopía confocal. Después de la eliminación del medio, las células se incubaron en tampón de bloqueo que contenía suero al 5 % (v/v) a 37 °C durante 15 min, se lavaron dos veces en tampón de unión antes de la incubación con aptámero 200 nM durante 30 min a 37 °C. La solución de aptámero se eliminó y las células se lavaron 3 veces durante 5 min cada una en un tampón de unión. Después, se añadió transferrina a las células y se incubaron durante 2 horas antes de que se añadiera Bisbencimida Hoechst 33342 (3 µg/ml) (Sigma) a las células durante los últimos 15 minutos de incubación. Las células se lavaron 3 veces durante 5 min cada una en tampón de unión antes de la visualización utilizando un microscopio confocal de barrido láser FluoView FV10i.

#### **45 Preparación de la tumoresfera e incubación con aptámeros y anticuerpos.**

Se colocaron en placa de una a dos mil células HT29 y HEK293T y se dejó que formaran esferas durante 7 días en medio DMEM/F12 (Invitrogen Life Technologies) que contenía factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos básico, insulina y B27. A los 7 días, las esferas (del tamaño de 300~400 µm) se lavaron tres veces en PBS que contenía MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM y se bloquearon durante 20 minutos usando un tampón de unión. Después, las esferas se incubaron con 100 nM de aptámero o anticuerpo AC-133 durante 30 min, 60 min, 120 min, 240 min o 24 horas. Después de cada punto de tiempo, las esferas se lavaron tres veces con PBS antes de la visualización utilizando el microscopio confocal FluoView FV10i.

#### **55 Ejemplo 1: SELEX celular facilita la selección de aptámeros contra objetivos proteicos complejos**

CD133 es una proteína pentaspan completa que contiene dos bucles extracelulares. Para seleccionar eficazmente los aptámeros solo contra la porción extracelular de la proteína, fue necesario idear un procedimiento que permitiera a los inventores expresar CD133 en su forma conformacional nativa. Con este fin, los inventores intentaron expresar de manera transitoria la proteína en la superficie de las células HEK293T. Usando Lipofectamine 2000, CD133 se transfirió en células HEK293T y se dejó que se expresara durante 72 horas antes de los experimentos SELEX, con la expresión confirmada por tinción con anticuerpo AC133. De manera similar a los experimentos SELEX anteriores, se incubó una biblioteca de ARN aleatoria de aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  especies que contienen ribosa modificada

60

con 2'fluoro en todas las pirimidinas con CD133 expresado en la superficie de las células HEK293T. El ARN no unido se eliminó mediante varias etapas de lavado antes de la RT-PCR, y el procedimiento se repitió durante un total de 12 rondas. La unión no específica se erradicó a través de la selección negativa utilizando una proteína irrelevante etiquetada con His transfectada en células HEK293T. El RFLP no radiactivo se realizó para confirmar la evolución de la especie durante las rondas iterativas y la confirmación del enriquecimiento se determinó mediante citometría de flujo utilizando células HEK293T transfectadas y no transfectadas. Como se muestra en la figura 1, la ronda seis mostró un aumento de más de 2,5 veces en la unión a las células HEK293T transfectadas con CD133, en comparación con las células HEK293T no transfectadas y las de la biblioteca no seleccionada.

10 Ejemplo 2: La ingeniería posterior a SELEX generó el aptámero específico para tumores más pequeño.

La ronda seis se clonó y se secuenció y los clones se marcaron de forma fluorescente con FITC utilizando un método interno. La especificidad de unión de cada clon se determinó utilizando células HEK293T transfectadas y no transfectadas y los resultados más alentadores se mostraron con dos aptámeros, designados CD133-1 y CD133-2.

15 Estos dos clones se truncaron secuencialmente para determinar el número más corto de bases requeridas para mantener la estructura de la región de unión del aptámero, además de reducir la  $K_d$  y, por lo tanto, aumentar la afinidad de unión (tabla 1).

**Tabla 1 Secuencias de aptámeros CD133 y sus truncamientos.**

	<b>Secuencia</b>	<b>Longitud (número de nucleótidos)</b>
CD 133-1	GAG ACA AGA AUA AAC GCU CAA CCC ACC CUC CUA CAU	81
	AGG GAG GAA CGA GUU ACU AUA GAG CUU CGA CAG GAG	
	GCU CAC AAC	
CD 133-1-1	GAG ACA AGA AUA AAC GCU CAA CCC ACC CTC CUA CAU	58
	AGG GAG GAA CGA GUU ACU AUA G	
CD 133-1-2	GCU CAA CCC ACC CUC CUA CAU AGG GAG GAA CGA GU	35
CD 133-1-2-1	CC ACC CUC CUA CAU AGG GUG G	21
CD 133-1-2-2	CC CUC CUA CAU AGG G	15
CD 133-2	GAGACAAGAAUAAACGCUCAAGGAAAGCGCUUAUUGUUUGC	85
	UAUGUUAGAACGUAUACUAUUUCGACAGGAGGCUCACAACA	
	GGC	
CD 133-2-1	CAGAACGUAUACUAUUCUG	19

20

El clon CD133-1 se truncó un total de cuatro veces para confirmar la región de unión del aptámero. Este clon se truncó con éxito a 15 nucleótidos, lo que lo convierte en el aptámero publicado más pequeño contra un antígeno específico de tumor, y el equivalente en tamaño al aptámero de ADN publicado más pequeño dirigido contra la trombina (Paborsky *et al.* (1993) J. Biol Chem 268:20808-11). Un segundo clon, CD133-2, también se investigó por su potencial para la unión con alta afinidad y especificidad a CD133. El truncamiento del aptámero dio como resultado una  $K_d$  reducida y, por lo tanto, una mayor afinidad por el objetivo (tabla 2).

25

**Tabla 2 Constantes de unión a la disociación de CD133 contra células CD133 positivas (HT-29 y Hep3B) y CD133 negativas (T98G y HEK293T)**

<b>Línea celular</b>	<b>CD133-1-2-2 (Kd, nM)</b>	<b>CD133-2-1 (Kd, nM)</b>
HT-29	82	145
Hep3B	32	52
HEK293T	1,20E+05	1,74E+06

T98G	2,75E+05	4763
------	----------	------

La confirmación de la sensibilidad y la especificidad de estos dos aptámeros se determinó utilizando líneas celulares CD133 positivas (HT-29 y Hep3B) y CD133 negativas (T98G y HEK293T) (tabla 2). La  $K_d$  aumentó ligeramente cuando las especies se sintetizaron comercialmente y se marcaron con un fluoróforo DyLight.

Ejemplo 3: Los aptámeros específicos de CD133 se internalizan a través de endocitosis mediada por receptor.

Como se ha indicado previamente, para que un aptámero se clasifique como un agente terapéutico eficaz contra el cáncer, debe internalizarse de manera eficiente después de la unión a su objetivo. Después de la incubación con células tanto CD133 positivas como CD133 negativas a 37 °C durante 30 minutos, se cuantificó la internalización utilizando microscopía confocal. La internalización se consideró específica debido a la falta de señal fluorescente vista con líneas celulares CD133 negativas. La internalización a través de endocitosis mediada por receptor se confirmó mediante bloqueo endocítico, tal como el agotamiento de potasio y los tratamientos hipertónicos. La eficacia de estos tratamientos se ha confirmado previamente utilizando transferrina (Shigdar *et al.* (2011 a) Cancer Sci 102:991-8).

Ejemplo 4: Los aptámeros específicos de CD133 muestran una penetración superior de las tumoresferas que los anticuerpos CD133.

En un intento por demostrar la eficacia de estos aptámeros como agentes terapéuticos contra el cáncer, los inventores investigaron el potencial de sus aptámeros para penetrar en una masa tumoral utilizando una tumoresfera in vitro como modelo para la selección in vivo. Los inventores generaron modelos de tumoresferas de las líneas celulares HT-29 (CD133<sup>+</sup>) y HEK293T (CD133<sup>-</sup>) e incubaron estos esferoides con CD133-1, CD133-2 y un anticuerpo AC133 durante 4 h seguido de microscopía confocal (figura 7).

Ejemplo 5: El conjugado de aptámero CD133-doxorrubicina es capaz de eliminar las células madre cancerosas de colon in vitro.

Con algunas excepciones, los fármacos de quimioterapia, tal como doxorrubicina, no destruyen las células madre cancerosas. Los inventores plantearon la hipótesis de si los fármacos quimioterapéuticos se administran a las células madre cancerosas con el aptámero CD133 y entran a las células a través de la endocitosis en lugar de la difusión aleatoria en las células como fármacos libres, podrían transformar los fármacos convencionales de quimioterapia en un eficaz asesino de células madre cancerosas. Para probar la capacidad de aptámero CD133-doxorrubicina en la eliminación de células madre de cáncer de colon in vitro, los inventores realizaron un ensayo de tumoresferas in vitro.

El aptámero CD133-2-1 se conjugó con doxorrubicina. Se sembraron tres dosis celulares diferentes de células de cáncer de colon (HT29) en placas de fijación ultra bajas de 96 pocillos con medio de células madre cancerosas (medio DMEM sin suero complementado con insulina, FGF, EGF y B27) que promueven la formación de tumoresferas. Las células se trataron con control de solución salina (PBS), 1  $\mu$ M de conjugado DOX-Aptámero o 1  $\mu$ M de doxorrubicina libre. La formación de la tumoresfera en cada pocillo se evaluó 3 días después del tratamiento (tabla 3).

En una dosis celular de 100 células/pocillo, tanto el conjugado CD133-2-1 Aptámero-Dox como la doxorrubicina libre no mostraron ningún efecto sobre la inhibición de la formación de tumoresferas. Sin embargo, con una dosis celular de 50 células por pocillo, se observó una ligera disminución en la frecuencia con el Aptámero-Dox. Es importante destacar que, bajo la condición de 10 células/pocillo, el tratamiento de 1  $\mu$ M de conjugado de DOX-Aptámero condujo a la eliminación completa de las células de tipo troncal de cáncer de colon capaces de formar tumoresferas. Por lo tanto, la administración de doxorrubicina dirigida a las células madre cancerosas a través del aptámero CD133 puede pasar por alto los mecanismos de quimiorresistencia conocidos que subyacen a la capacidad de resistencia de las células madre cancerosas a la terapia anticancerosa convencional.

**Tabla 3 Formulación de tumoresferas después del tratamiento**

	Control (PBS)	Doxorrubicina (Dox)	Aptámero-Doxorrubicina conjugado
<b>100 células/pocillo</b>	5/5	5/5	5/5
<b>50 células/pocillo</b>	5/5	5/5	3/5

10 células/pocillo	4/5	5/5	0/5
--------------------	-----	-----	-----

### Observaciones

- Se considera que las células madre cancerosas (CSC) son la raíz del cáncer y la causa de la recidiva del cáncer.
- 5 Este modelo ha ganado aceptación porque explica la resistencia a la radiación y la quimioterapia (Visvader & Lindeman (2012) Cell Stem Cell 10:717-28), y ha llevado a numerosos intentos de dirigirse específicamente a esta población de células dentro del tumor. Si bien no hay un marcador específico que defina todas las CSC, varios marcadores, incluidos CD133, CD44, ALDH, EpCAM y ABCG2 (Hu & Fu (2012) Cancer Res 2:340-56; Visvader & Lindeman 2012 anteriormente), han demostrado ser útiles para definir la población de CSC en tumores sólidos.
- 10 CD133 se ha visto implicado como un marcador de la población de CSC en cánceres de cerebro, próstata, páncreas, melanoma, colon, hígado, pulmón y ovario. Si bien la función de CD133 aún no se ha dilucidado, este marcador está regulado positivamente en condiciones hipóxicas y se ha asociado con el mimetismo vasculogénico en el cáncer de mama triple negativo y el cáncer de próstata (Liu *et al.* (2012a) Cancer Biol Ther May 1 13(7); Liu *et al.* (2012b) Oncogene Apr 2), lo que indica la importancia de CD133 en el crecimiento tumoral y la metástasis. Dada
- 15 la importancia de estas células CD133<sup>+</sup> para la generación, el mantenimiento y la propagación continua del tumor, se han aislado los aptámeros de ARN contra CD133.

- Los inventores han descrito previamente el éxito del procedimiento SELEX para aislar aptámeros que se dirigen a otro marcador de CSC (Shigdar *et al.* 2011a anteriormente). El aislamiento de aptámeros dirigidos a CD133 requirió
- 20 una modificación a los protocolos previos debido a la naturaleza pentaspan de esta proteína y la necesidad de usar proteínas en su forma conformacional para la selección de aptámeros. El éxito del protocolo de selección se demostró utilizando ensayos de unión de citometría de flujo, así como análisis de RFLP. Se mostró una evolución exitosa después del sexto ciclo SELEX, y se clonaron varios aptámeros. Se eligieron dos aptámeros para una caracterización adicional utilizando líneas celulares tanto CD133 positivas como negativas. Estos aptámeros también
- 25 se truncaron para determinar el tamaño mínimo requerido para mantener la afinidad de unión. Uno de estos aptámeros, CD133-1 pudo truncarse a un tamaño de 15 bases. Este truncamiento hace que este sea el aptámero de ARN más pequeño descrito y de igual tamaño al aptámero de ADN dirigido a la trombina (Paborsky *et al.* 1993 anteriormente). Se demostró que ambos aptámeros son sensibles y específicos, y lo que es más importante, estos dos aptámeros se internalizaron rápidamente mediante endocitosis mediada por receptores después de la unión a
- 30 su objetivo. Esta última característica de los aptámeros es un requisito necesario para que estos aptámeros se modifiquen como reactivos agnósticos.

- Los aptámeros tienen muchos beneficios que los convierten en modalidades de acompañamiento ideales tanto para el tratamiento como para la obtención de imágenes de masas tumorales. Su pequeño tamaño significa que son
- 35 capaces de penetrar en el tumor mucho más eficientemente que las opciones de inmunoterapia convencionales, y estos ácidos nucleicos también carecen de inmunogenicidad, lo que conduce a muchos menos efectos secundarios. A través de la funcionalización adicional, ya sea conjugando directamente o encapsulando fármacos en nanopartículas, los aptámeros pueden funcionar como acompañamientos farmacológicos muy eficaces. Ha habido varios informes de conjugación directa de fármacos quimioterapéuticos, tales como doxorubicina, ARNsi o ribozima
- 40 para dirigirse a aptámeros, y la exitosa funcionalización de las nanopartículas a través de la unión de aptámeros a su superficie. Si bien algunos aptámeros pueden ser eficaces únicamente al unirse a su objetivo, la mayoría de los aptámeros son mucho más exitosos como guía para las sustancias citotóxicas.

### LISTA DE SECUENCIAS

- 45 <110> Deakin University
- <120> Aptámeros CD133 para la detección de células madre cancerosas
- 50 <130> 513837
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.5
- 55 <210> 1
- <211> 15
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- 60

ES 2 741 949 T3

	<220>		
	<223> sintetizado químicamente		
	<400> 1		
5	<b>cccuccuaca uaggg</b>		15
	<210> 2		
	<211> 81		
	<212> ARN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintetizado químicamente		
	<400> 2		
	<b>gagacaagaa uaaacgcuca acccaccuc cuacauaggg aggaacgagu uacuauagag</b>		60
15	<b>cuucgacagg aggcucacaa c</b>		81
	<210> 3		
	<211> 58		
	<212> ARN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintetizado químicamente		
	<400> 3		
25	<b>gagacaagaa uaaacgcuca acccaccuc cuacauaggg aggaacgagu uacuauag</b>		58
	<210> 4		
	<211> 35		
	<212> ARN		
30	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintetizado químicamente		
	<400> 4		
35	<b>gcucaaccca cccuccuaca uagggaggaa cgagu</b>		35
	<210> 5		
	<211> 21		
	<212> ARN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintetizado químicamente		
45	<400> 5		
	<b>ccaccuccu acauagggug g</b>		21
	<210> 6		
	<211> 19		
50	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintetizado químicamente		
55	<400> 6		
	<b>cagaacguau acuaauucug</b>		19

# ES 2 741 949 T3

<210> 7  
<211> 15  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

5  
<220>  
<223> sintetizado químicamente

<400> 7

10 **agaacguaua cuauu** 15

<210> 8  
<211> 85  
<212> ARN  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sintetizado químicamente

20 <400> 8

**gagacaagaa uaaacgcuca aggaaagcgc uuauuguuug cuauguuaga acguauacua** 60

**uuucgacagg aggcucacaa caggc** 85

## REIVINDICACIONES

1. Un aptámero de ARN que se une específicamente a CD133, comprendiendo el aptámero la secuencia de (i) 5' -CCCUCUACAUAGGG-3' (SEQ ID NO:1), (ii) 5' -CAGAACGUUACUUAUUCUG- 3' (SEQ ID NO:6) (iii) 5' -AGAACGUUACUUAU- 3' (SEQ ID NO:7) o (iv) una secuencia que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones dentro de la secuencia de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:7.
2. El aptámero según la reivindicación 1, que tiene una constante de disociación de aproximadamente 150 nM o menos.
3. El aptámero según la reivindicación 1 o 2, que comprende una secuencia seleccionada de las siguientes:
  - (i) 5'- CC CUC CUA CAU AGG G -3' (SEQ ID NO:1);
  - (ii) 5'- GAG ACA AGA AUA AAC GCU CAA CCC ACC CUC CUA CAU AGG GAG GAA CGA GUU ACU AUA GAG CUU CGA CAG GAG GCU CAC AAC -3' (SEQ ID NO:2);
  - (iii) 5'- GAG ACA AGA AUA AAC GCU CAA CCC ACC CUC CUA CAU AGG GAG GAA CGA GUU ACU AUA G -3' (SEQ ID NO:3);
  - (iv) 5'- GCU CAA CCC ACC CUC CUA CAU AGG GAG GAA CGA GU -3' (SEQ ID NO:4); y
  - (v) 5'- CC ACC CUC CUA CAU AGG GUG G -3' (SEQ ID NO:5).
4. El aptámero según la reivindicación 1, que comprende la secuencia 5' -AGAACGUUACUUAU- 3' (SEQ ID NO:7).
5. El aptámero según la reivindicación 4, que comprende la secuencia
  - (i) 5' -CAGAACGUUACUUAUUCUG- 3' (SEQ ID NO:6) o
  - (ii) 5' -GAG ACA AGA AUA AAC GCU CAA GGA AAG CGC UUA UUG UUU GCU AUG UUA GAA CGU AUA CUA UUU CGA CAG GAG GCU CAC AAC AGG C- 3' (SEQ ID NO:8).
6. El aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el aptámero consiste en la secuencia de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:6.
7. El aptámero según cualquier reivindicación anterior que comprende una o más modificaciones que aumentan la estabilidad del aptámero.
8. El aptámero según cualquier reivindicación anterior donde las bases de pirimidina del aptámero tienen una modificación 2'-fluoro.
9. El aptámero según cualquier reivindicación anterior, donde el extremo 3' del aptámero se modifica para protegerlo de la digestión con nucleasa.
10. El aptámero según cualquier reivindicación anterior, donde el aptámero se une específicamente a la célula o células madre cancerosas CD133<sup>+</sup>.
11. Un agente de diagnóstico que comprende el aptámero de ARN según cualquier reivindicación anterior acoplado a una etiqueta detectable seleccionada de una enzima, grupo protésico, material fluorescente, material luminiscente, material bioluminiscente, etiqueta densa de electrones, etiquetas para IRM y material radioactivo y cualquier combinación de estos.
12. Un agente anticanceroso que comprende el aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, acoplado a un resto seleccionado de una toxina, un radionúclido y un agente quimioterapéutico, y una combinación de los mismos.
13. Un método para identificar una célula o células que expresan CD133 y/o una célula o células madre cancerosas en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene cáncer, comprendiendo el método poner en contacto la célula con un aptámero de ARN aislado según cualquiera de las

reivindicaciones 3 a 10, o el agente de diagnóstico según la reivindicación 11.

14. El aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, o el agente anticanceroso según la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto.

5

15. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del aptámero según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, un agente anticanceroso según la reivindicación 12, junto con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

**1. Un aptámero de ARN CD133 de 15 mer (CD133-1-2-2)**

5'-CCCUCCUACAUAGGG-3'

**2. Un aptámero de ARN CD133 de 19 mer (CD133-2-1)**

5'-CAGAACGUAUACUAUUCUG-3'

**FIGURA 1**

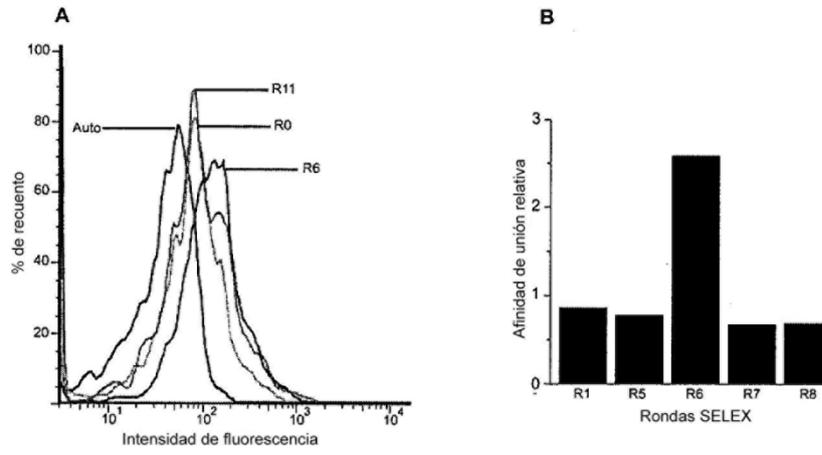


FIGURA 2

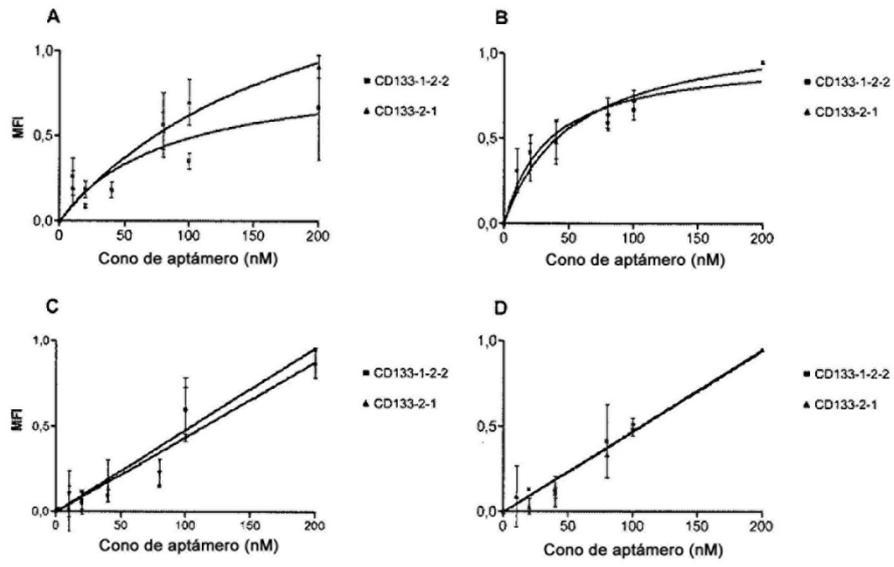


FIGURA 3

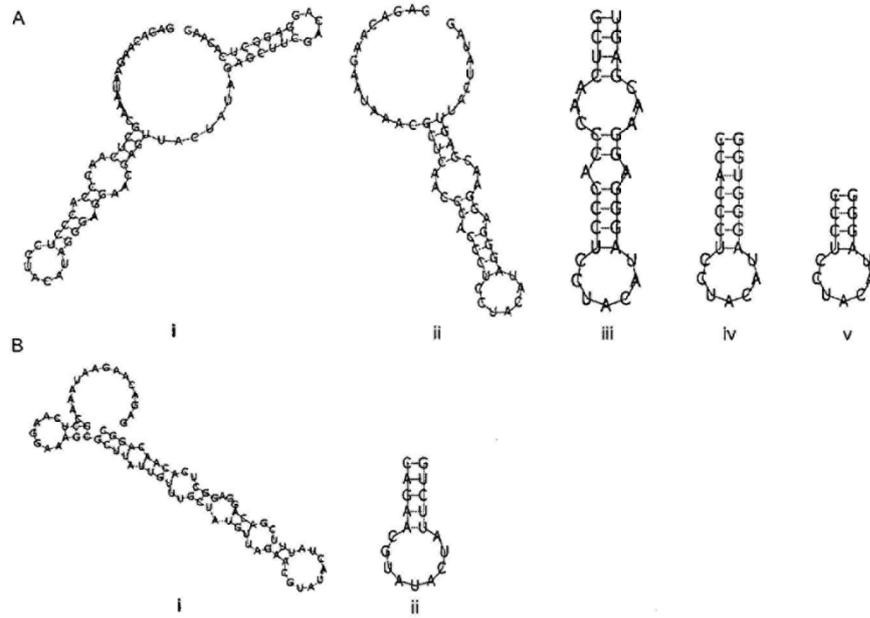


FIGURA 4

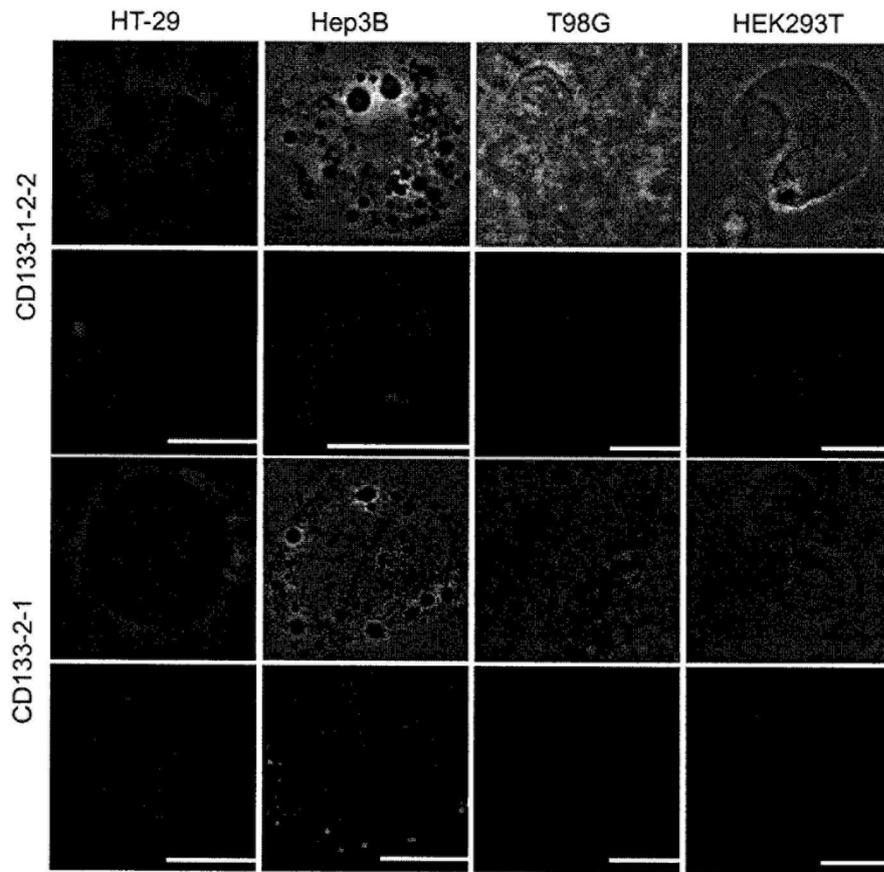


FIGURA 5

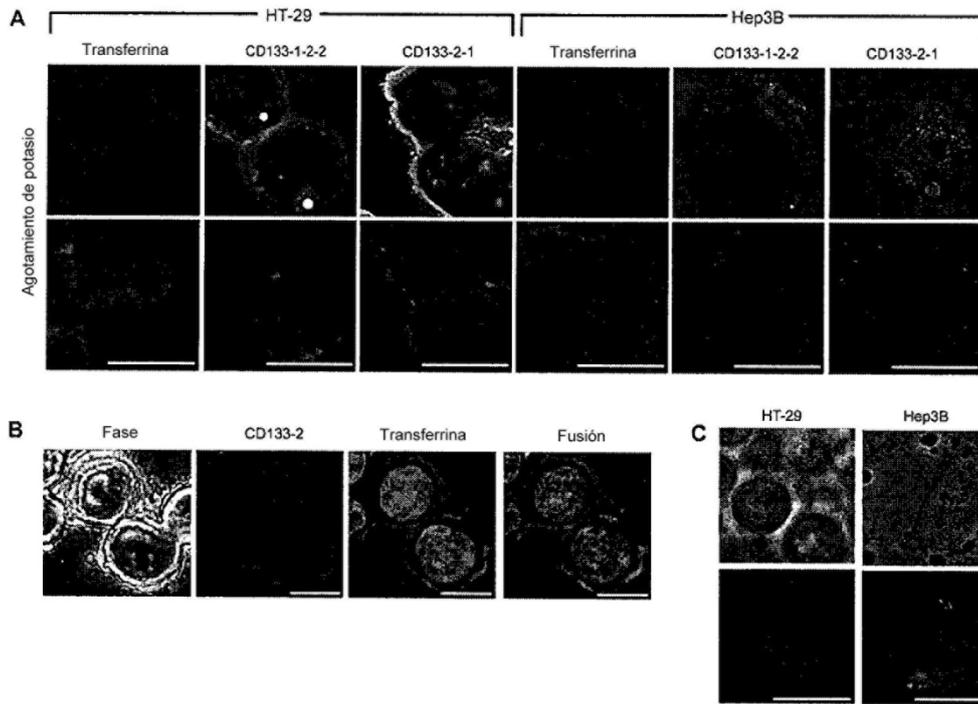


FIGURA 6

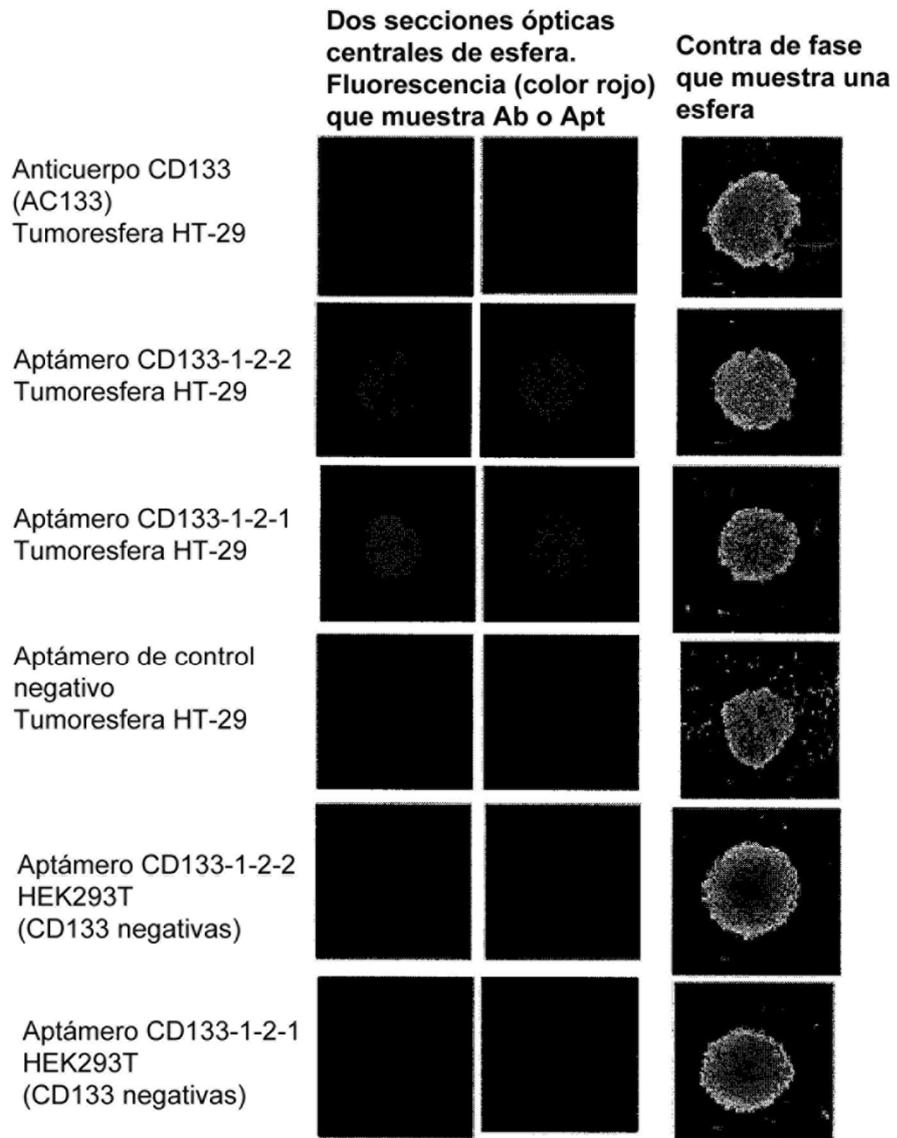


FIGURA 7