

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 723**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6811** (2008.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2015 PCT/EP2015/072566**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16050850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2015 E 15777645 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3201353**

54 Título: **Un método para identificar o producir un aptámero**

30 Prioridad:

**02.10.2014 US 201462058703 P**

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

**23.06.2020**

73 Titular/es:

**RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-  
UNIVERSITÄT BONN (100.0%)  
Regina-Pacis-Weg 3  
53113 Bonn, DE**

72 Inventor/es:

**MAYER, GUENTER y  
TOLLE, FABIAN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 768 723 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**

Un método para identificar o producir un aptámero

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos técnicos de técnicas para producir oligonucleótidos, que se unen específicamente a una diana. La presente invención se refiere a un método para identificar o producir un aptámero.

**10 Antecedentes de la invención**

La evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX), también denominada selección *in vitro* o evolución *in vitro*, es una técnica para producir oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenario, que se unen específicamente a un ligando diana. El método SELEX se describe, por ejemplo, en el documento US 5270163. En el método SELEX, una mezcla candidata de ácidos nucleicos monocatenarios que tienen regiones de secuencia aleatoria se pone en contacto con una estructura diana y se seleccionan y amplifican aquellos ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana. Después de varias iteraciones, se obtiene un ácido nucleico con buena afinidad por la diana. Keefe y Cload (Current Opinion in Chemical Biology 2008, 12:448-456) desvelan SELEX con nucleótidos modificados. El documento US 2914/100120 desvela aptámeros sintetizados químicamente para que contengan 5-etinil-dU.

Muchas dianas son difíciles de abordar usando los enfoques SELEX tradicionales. Una razón puede ser la limitada diversidad química de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos químicamente modificados añaden diversidad que puede abordar este problema. Sin embargo, los nucleótidos-trifosfatos químicamente modificados pueden no tener compatibilidad con las etapas enzimáticas, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), del proceso de selección *in vitro*. Por lo tanto, las posibles modificaciones químicas de las moléculas de ADN adecuadas para la selección *in vitro* son limitadas. Desde un punto de vista práctico, el uso de tales modificaciones no es fácil de lograr ya que la mayoría de ellas no son comercialmente accesibles y, de esta manera, requieren laboriosa síntesis química antes de su uso.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método que permita la introducción de entidades químicas adicionales en ácidos nucleicos durante el proceso de selección de aptámeros.

**Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 6 adjuntas.

Se proporciona un método para identificar o producir un aptámero que comprende las etapas de:

- 40 (a) Preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, en donde la mezcla comprende al menos un nucleótido que se modifica para comprender una funcionalización introducida por química de clic, en donde el nucleótido modificado comprende una nucleobase modificada con alquino que se modifica adicionalmente a través de una cicloaddición 1,3 dipolar de una azida para producir una nucleobase modificada con azida-alquino, en donde la nucleobase que se ha modificado para contener el grupo azida-alquino era un nucleótido etinil-dU, dA, dC o dG;
- 45 (b) Poner en contacto la mezcla candidata con una muestra diana;
- (c) Separar los ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana de aquellos que no se unen;
- (d) Amplificar los ácidos nucleicos de unión para producir una población de ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana, identificando o produciendo de esta manera un aptámero, en donde los ácidos nucleicos de unión se amplifican por PCR usando una nucleobase modificada con etinilo y nuevamente se someten a un ciclo de selección *in vitro* hasta que se detecte un enriquecimiento de ácidos nucleicos que se unen a la diana.

Sorprendentemente se ha descubierto que el método permite introducir entidades químicas adicionales en el ADN durante el proceso de selección. De manera ventajosa, la modificación solo está presente transitoriamente durante el ciclo de selección. Esto permite un alto grado de compatibilidad con la etapa enzimática del proceso de selección. Este enfoque permite además la introducción de entidades químicas más grandes en las bibliotecas de ADN que no pueden usarse usando los métodos del estado de la técnica. El método tiene una amplia aceptación de diversos sustratos azida, que están disponibles en el mercado o son accesibles por síntesis química.

El método puede comprender además el desplazamiento de una cadena de al menos un ácido nucleico amplificado en la etapa (d) y la modificación adicional del ácido nucleico para introducir otra funcionalización.

En el método de la presente invención, la mezcla candidata comprende al menos una nucleobase que se modifica para comprender un grupo químico azida-alquino.

En realizaciones, la nucleobase modificada con azida-alquino comprende restos alifáticos, aromáticos, cargados, básicos, ácidos, heteroaromáticos, de tipo azúcar, que contienen metales o peptídicos.

En realizaciones, la nucleobase que se modificará para contener un grupo químico azida-alquino es un nucleótido etinil-, propinil- o butinil- dU, dA, dC o dG.

5 En el método de la presente invención, la etapa de amplificación (d) emplea una reacción en cadena de la polimerasa usando una nucleobase modificada con alquino que se modifica adicionalmente a través de una cicloadición 1,3 dipolar de una azida para producir una nucleobase modificada con azida-alquino.

10 En realizaciones, la azida comprende una molécula sensible a la luz.

En realizaciones, la muestra diana se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido, péptido, célula, fragmento celular, membrana celular, molécula orgánica pequeña, cultivo celular, muestra de tejido, microvesícula, muestra de fluido biológico y combinación de los mismos.

15 En realizaciones, la mezcla candidata de ácidos nucleicos en (a) está al menos un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % modificada para comprender la funcionalización introducida por la química de clic.

20 De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para detectar una presencia o nivel de una diana en una muestra, que comprende poner en contacto al menos un aptámero con la muestra y detectar un evento de unión entre la diana en la muestra y el al menos un aptámero, en donde el al menos un aptámero se identifica o se produce por el método de cualquier reivindicación.

25 En realizaciones, la detección comprende realizar un inmunoensayo, ELISA, transferencia Western, ensayo sándwich, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, citometría de flujo, ensayo de microesferas, matriz proteómica, secuenciación o una combinación de las mismas.

30 En realizaciones, la presencia del nivel de la diana en la muestra se compara con un nivel de referencia.

En realizaciones, la comparación se usa para caracterizar un fenotipo en la muestra.

35 En realizaciones, la caracterización comprende un diagnóstico, pronóstico o tratánóstico y el fenotipo comprende la presencia de una enfermedad o trastorno.

En realizaciones, La enfermedad o trastorno comprende un cáncer.

40 De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un reactivo que comprende un ligando de ácido nucleico capaz de unirse a una muestra diana, en donde el ligando de ácido nucleico comprende al menos una nucleobase modificada para contener un grupo químico azida-alquino.

En realizaciones, el grupo químico azida-alquino comprende una molécula sensible a la luz.

45 En realizaciones, la nucleobase modificada con azida-alquino comprende restos alifáticos, aromáticos, cargados, básicos, ácidos, heteroaromáticos, de tipo azúcar, que contienen metales o peptídicos.

En realizaciones, la nucleobase que se modificará para contener un grupo químico azida-alquino es un nucleótido etinil-, propinil- o butinil- dU, dA, dC o dG.

50 En realizaciones, el reactivo está marcado con un radioisótopo emisor de rayos gamma.

En realizaciones, un principio activo se conjuga con el reactivo.

En realizaciones, el principio activo comprende un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

55 En realizaciones, el agente terapéutico o agente de diagnóstico es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de quinasa, principios biológicamente activos, moléculas biológicas, radionúclidos, adriamicina, antibióticos ansamicina, asparaginasa, bleomicina, busulfán, cisplatino, carboplatino, carmustina, capecotabina, clorambucilo, citarabina, ciclofosfamida, camptotecina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, etopósido, epotilonas, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, mecloretamina, mercaptopurina, melfalán, metotrexato, rapamicina (sirolimus), mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nitrosurea, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, procarbazona, rituximab, estreptozocina, tenipósido, tioguanina, tiotepa, taxanos, vinblastina, vincristina, vinorelbina, taxol, combretastatinas, discodermolidas, transplatino, compuestos del factor de crecimiento endotelial anti-vascular ("anti-VEGF"), compuestos receptores del factor de crecimiento antiepitérmico ("anti-EGFR"), 5-fluorouracilo y derivados, radionúclidos, toxinas polipeptídicas,

inductores de apoptosis, sensibilizadores de terapia, enzima o fragmento activo de la misma y combinaciones de los mismos.

5 De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona el uso del reactivo para llevar a cabo el método de detección de una presencia o nivel de una diana en una muestra.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del reactivo o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación se proporciona la composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del reactivo o una sal del mismo y se proporciona un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de o para mejorar una enfermedad o trastorno o se proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad o trastorno, que comprende administrar la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesita.

En realizaciones, administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto da como resultado: (a) una mejora de la administración del principio activo a un sitio de la enfermedad en relación con la administración del principio activo solo; o

20 (b) una mejora de la eliminación de la diana dando como resultado una disminución de al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % en un nivel de sangre de la diana; o (c) una disminución de la actividad biológica de la diana del reactivo en al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 %.

25 En realizaciones, la diana comprende una población de microvesículas y la actividad biológica de la población de microvesículas comprende la supresión inmune o la transferencia de información genética.

En realizaciones, la enfermedad o trastorno comprende una enfermedad o trastorno neoplásicos, proliferativos, inflamatorios, metabólicos, cardiovasculares o neurológicos.

30 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada de la invención y de las reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 muestra una representación esquemática de una realización del método.  
La Figura 2 muestra los resultados de un ensayo de unión de FACS entre la biblioteca enriquecida de 15ª ronda y perlas magnéticas recubiertas de GFP. La biblioteca de 15ª ronda marcada con Cy5 da lugar a una intensidad de fluorescencia media dependiente de concentración mucho más alta en perlas de GFP en comparación con la biblioteca de partida. Este aumento en la afinidad de unión dependiente del clic demuestra el enriquecimiento exitoso de las secuencias de unión de GFP después de 15 rondas de SELEX de clic.

40 La Figura 3-A) muestra "C12" una secuencia monoclonal aislada de la biblioteca enriquecida de 15ª ronda, que contiene seis nucleótidos de etinil-dU (EdU) cliqueables. La Figura 7-B muestra esquemáticamente la estructura química de un nucleótido de etinil-dU incorporado en una cadena de ADN.

45 La Figura 4 muestra los resultados de un ensayo de unión de FACS entre la secuencia monoclonal "C12" representada en la figura 7- A y las perlas magnéticas recubiertas de proteína. C12 da lugar a una intensidad de fluorescencia media dependiente de la concentración mucho más alta en las perlas de GFP en comparación con la biblioteca inicial. Sin embargo, en las perlas magnéticas recubiertas con ERK2 o estreptavidina, la situación se invierte y C12 muestra menos intensidad de fluorescencia media que la biblioteca de inicio. Esto muestra una alta especificidad de C12 por GFP en comparación con las dos proteínas de control.

50

### Definiciones

55 Como se usa en el presente documento, el término "aptámero" se refiere a un pequeño oligonucleótido monocatenario que reconoce su diana con alta especificidad y se une a la diana con alta afinidad.

Como se usa en el presente documento, el término "alquino" se refiere a un resto de carbono insaturado que tiene un triple enlace carbono carbono entre dos átomos de carbono.

60 Como se usa en el presente documento, el término "azida" se refiere a un grupo funcional RN<sub>3</sub>. El grupo R se refiere a una modificación química o entidad química adicional que puede introducirse en el ADN. Por ejemplo, el grupo R puede ser una entidad química fotoescindible voluminosa.

65 Como se usa en el presente documento, la frase "grupo químico azida-alquino" se refiere a un producto de reacción de un alquino y una azida. La reacción puede ser una cicloaddición 1,3-dipolar de la azida con el alquino. A través de la cicloaddición 1,3-dipolar de una azida con un alquino, el enlace azida-alquino puede ser un enlace triazol.

Como se usa en el presente documento, La frase "química de clic" se refiere a reacciones bio-ortogonales conocidas por los expertos en la materia. La frase "química de clic" puede referirse a una cicloadición 1,3-dipolar. Un ejemplo de química de clic es la cicloadición 1,3-dipolar de una azida a un alquino, por ejemplo, usando la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu (I) de una azidas con un alquino (CuAAC) o la cicloadición de azida-alquino promovida por cepa libre de cobre (SPAAC).

Como se usa en el presente documento, la frase "mezcla candidata" se refiere a una mezcla de ácidos nucleicos de secuencia diferente, a partir de la cual se selecciona un ligando deseado. La fuente de una mezcla candidata puede ser de ácidos nucleicos naturales o fragmentos de los mismos, ácidos nucleicos sintetizados químicamente, ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente o ácidos nucleicos fabricados mediante una combinación de las técnicas anteriores.

Como se usa en el presente documento, el término "ligando" se refiere a un ácido nucleico que se une a otra molécula, por ejemplo, la diana. En una mezcla de ácidos nucleicos candidatos, un ligando se une con mayor afinidad que el de la mezcla a granel. En una mezcla candidata puede estar comprendido más de un ligando para una diana dada. Los ligandos pueden diferir entre sí en sus afinidades de unión para la diana.

Como se usa en el presente documento, el término "nucleobase" se refiere a los compuestos biológicos que contienen nitrógeno que se encuentran dentro de los nucleótidos y nucleótidos de ADN y ARN, habitualmente denominados bases. Las nucleobases primarias son citosina (C), guanina (G), adenina (A), timina (T) y uracilo (U).

Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a los bloques de construcción básicos de ácidos nucleicos que comprenden o consisten en una nucleobase unida, ribosa o desoxirribosa y al menos un grupo fosfato.

Si no se indica de otra manera, el término "ácido nucleico" se refiere a un ácido ribonucleico o un ácido desoxirribonucleico, monocatenario o bicatenario. El aptámero de acuerdo con la invención, por lo tanto, puede proporcionarse en forma de una molécula de ADN o ARN monocatenario.

Como se usa en el presente documento, la frase "muestra diana" se refiere a cualquier compuesto de interés para el que se desea un aptámero. Una muestra puede ser cualquier material, que probablemente contiene una diana a determinar, incluyendo cualquier muestra líquida o fluida o material sólido, incluyendo una muestra derivada de una fuente biológica. El término muestra se refiere a polipéptidos, péptidos o moléculas orgánicas pequeñas. El término muestra también se refiere a material biológico, por ejemplo celdas, orgánulos celulares, o tejidos, o extractos de cualquiera de los anteriores, fluidos biológicos, moléculas biológicas o sobrenadantes.

Como se usa en el presente documento, El término "amplificación" se refiere a cualquier proceso o combinación de etapas de proceso que aumenta la cantidad o el número de copias de una molécula tales como un ácido nucleico. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método a modo de ejemplo para la amplificación de ácidos nucleicos.

Como se usa en el presente documento, el término "partición" se refiere a cualquier proceso mediante el cual los aptámeros unidos a la muestra diana pueden separarse de los ácidos nucleicos no unidos a la diana. El particionamiento, por ejemplo, puede lograrse mediante la inmovilización de los ácidos nucleicos unidos a la diana en perlas magnéticas o mediante electroforesis capilar de los ácidos nucleicos unidos contra la diana. La elección del método de partición dependerá de las propiedades de la muestra diana y de los ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana y puede realizarse de acuerdo con los principios y propiedades conocidos por los expertos en la materia.

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención. En particular, a menos que se indique de otra manera, un término como se usa en el presente documento recibe la definición que se proporciona en el diccionario Oxford de bioquímica y biología molecular, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reimpresso en 2003, ISBN 0 19 850673 2.

Debería observarse que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/a", "uno" y "el/la" incluyen las referencias plurales salvo que el contenido indique claramente otra cosa. De esta manera, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. También debe tenerse en cuenta que el término "o" se emplea generalmente en su sentido, incluyendo "y/o" a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

### Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la invención, se proporciona un método para identificar o producir un aptámero que comprende las etapas de:

- (a) Preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, en donde la mezcla comprende al menos un nucleótido que se modifica para comprender una funcionalización introducida por química de clic, en donde el nucleótido modificado comprende una nucleobase modificada con alquino que se modifica adicionalmente a través de una cicloadición 1,3 dipolar de una azida para producir una nucleobase modificada con azida-alquino, en donde la nucleobase que se ha modificado para contener el grupo azida-alquino era un nucleótido etinil-dU, dA, dC o dG;
- (b) Poner en contacto la mezcla candidata con una muestra diana;
- (c) Separar los ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana de aquellos que no se unen;
- (d) Amplificar los ácidos nucleicos de unión para producir una población de ácidos nucleicos que se unen a la muestra diana, identificando o produciendo de esta manera un aptámero, en donde los ácidos nucleicos de unión se amplifican por PCR usando una nucleobase modificada con etinilo y nuevamente se someten a un ciclo de selección *in vitro* hasta que se detecte un enriquecimiento de ácidos nucleicos que se unen a la diana.

El método permite la introducción de entidades químicas adicionales en el ADN durante el proceso de selección. De manera ventajosa, la modificación solo está presente transitoriamente durante el ciclo de selección. Esto permite un alto grado de compatibilidad con la etapa enzimática del proceso de selección. Este enfoque permite además la introducción de entidades químicas más grandes en las bibliotecas de ADN que no pueden usarse usando métodos conocidos. El método tiene una amplia aceptación de diversos sustratos azida, que están disponibles en el mercado o son accesibles por síntesis química.

En una realización, el método comprende además el desplazamiento de una cadena de al menos un ácido nucleico amplificado en la etapa (d) y la modificación adicional del ácido nucleico para introducir otra funcionalización.

Una biblioteca de ADN modificada para comprender una funcionalización, por ejemplo, un grupo químico azida-alquino, puede incubarse con una molécula diana. Después de la incubación, las secuencias no unidas se retirarán y las moléculas unidas se recuperarán y se amplificarán por PCR. El método de desplazamiento de una hebra del ácido nucleico puede realizarse de acuerdo con principios y propiedades conocidas por los expertos en la materia. El ADN monocatenario puede lograrse mediante la digestión selectiva con exonucleasa lambda de una hebra. El ADN resultante puede modificarse nuevamente reintroduciendo la modificación química. Esta biblioteca nuevamente puede estar sujeta al ciclo de selección *in vitro* hasta que pueda detectarse un enriquecimiento de secuencias de unión a diana.

En un primer ciclo SELEX, en la etapa (a) puede proporcionarse una mezcla candidata de ácidos nucleicos que se prepara por síntesis química. Cuando se desplaza una cadena de al menos un ácido nucleico amplificado en la etapa (d) y se modifica adicionalmente el ácido nucleico para introducir otra funcionalización, por ejemplo, un grupo químico azida-alquino, en los siguientes ciclos las mezclas candidatas pueden prepararse de forma semi enzimática.

Particularmente, la química de clics sobre la base de cicloadiciones dipolares 1,3 se puede utilizar en sistemas biológicos acuosos para introducir entidades químicas. Se han identificado varios tipos de reacción que son utilizables para la química del clic a través de la cicloadición dipolar 1,3. Ha demostrado ser particularmente útil ha demostrado la cicloadición 1,3 dipolar de una azida a un alquino. Además, La modificación de la nucleobase ha demostrado ser útil en el método. Por lo tanto, la mezcla candidata comprende al menos una nucleobase que se modifica para comprender un grupo químico azida-alquino.

En una realización, la etapa de amplificación (d) emplea una reacción en cadena de la polimerasa usando una nucleobase modificada con alquino que se modifica adicionalmente a través de cicloadición 1,3 dipolar de una azida para producir una nucleobase modificada con azida-alquino.

Los ácidos nucleicos de la mezcla candidata pueden ser ADN monocatenario. La introducción de entidades químicas adicionales en el ADN durante el proceso de selección puede lograrse utilizando una nucleobase modificada con 5 alquinos, por ejemplo timina. Los nucleótidos-trifosfatos modificados con 5-C8-alquino, por ejemplo, desoxitimidinas, están disponibles en el mercado o pueden sintetizarse. Tales nucleobases modificadas con 5-C8-alquino, por ejemplo, desoxitimidinas, pueden introducirse en el ADN por PCR. La modificación puede derivatizarse aún más con la denominada química bio-ortogonal, por ejemplo, usando la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu (I) de azidas respectivas con el alquino. Además de la cicloadición azida-alquino catalizada por Cu (I) (CuAAC), las reacciones de cicloadición de azida-alquino (SPAAC) promovidas por cepa sin cobre también son utilizables. En aplicaciones en sistemas celulares o vivos, la cicloadición de azida-alquino promovida por cepa puede superar los problemas de toxicidad asociados al uso de Cu (I).

Puede añadirse cualquier cantidad de modificaciones químicas deseables a la biblioteca de oligonucleótidos usada para fines de selección. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen pero no se limitan a restos alifáticos, aromáticos, cargados, básicos, ácidos, heteroaromáticos, de tipo azúcar, que contienen metales o peptídicos.

La nucleobase que se modificará para contener un grupo químico azida-alquino es un nucleótido etinil-dU, dA, dC o dG. La nucleobase que se modificará para contener un grupo químico azida-alquino puede ser un nucleótido de etinil-dU o un nucleótido de etinil-dA, un nucleótido de etinil-dC o un nucleótido de etinil-dG.

Las bibliotecas de ADN que se modifican de esta manera pueden emplearse para fines de selección *in vitro*. Por lo tanto, esta reacción permite introducir modificaciones químicas en el ADN aplicable en SELEX. De este modo, puede mejorarse la diversidad química de las bibliotecas de ADN.

5 La mezcla de ácidos nucleicos de partida o candidata puede modificarse de modo que al menos un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de los miembros de la mezcla se modifican para comprender la funcionalización introducida por la química de clic. Menos del 100 % de modificación puede permitir una mayor diversidad al permitir que se modifiquen ciertas posiciones en un oligonucleótido pero no otras, mientras que la modificación del 100 % asegura la consistencia durante el proceso de selección. En algunas realizaciones, se realizan diferentes modificaciones en diferentes posiciones en el oligonucleótido para mejorar aún más la diversidad.

15 En una realización, la azida puede modificarse con una molécula sensible a la luz. El uso de modificaciones fotosensibles mejora aún más el enfoque hacia los restos voluminosos que se introducirán y utilizarán en el proceso de selección. También permite la selección directa de aptámeros de fotorrespuesta. Esto permite el desarrollo de protocolos de selección completamente nuevos.

20 La molécula sensible a la luz puede ser un grupo voluminoso que inhibe la amplificación por PCR. Cuando comprende un resto fotoescindible, puede iniciarse una escisión del grupo voluminoso por irradiación, por ejemplo con luz ultravioleta, y la molécula modificada de azida-alquino más pequeña restante puede estar disponible para PCR.

25 El método puede aplicarse a una amplia diversidad de muestras diana. Esto permite una amplia diversidad de muestras incluyendo estructuras biológicas. En una realización, la muestra diana se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido, péptido, proteína, célula, fragmento celular, membrana celular, microvesícula, molécula orgánica pequeña, muestra de fluido biológico y combinación de los mismos. Especialmente, el método no se limita a muestras purificadas, de polipéptidos, péptidos o moléculas orgánicas pequeñas, sino que es extendible a contextos biológicos altamente complejos tales como muestras de fluidos biológicos o incluso directamente a las membranas de las células.

35 Otro aspecto, la descripción se refiere a un reactivo que comprende un ligando de ácido nucleico capaz de unirse a una muestra diana, en donde el ligando de ácido nucleico comprende al menos una nucleobase modificada para contener un grupo químico azida-alquino.

40 La nucleobase modificada, por ejemplo, puede ser la timina. La modificación puede lograrse usando una desoxitimidina modificada con 5-C8-alquino que puede introducirse en el ADN por PCR. La modificación puede derivatizarse aún más con la denominada química bio-ortogonal, por ejemplo, usando la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu (I) de unas azidas respectivas con el alquino.

45 En una realización, el grupo químico azida-alquino comprende una molécula sensible a la luz. La molécula sensible a la luz puede ser un grupo voluminoso que inhibe la amplificación por PCR del ligando de ácido nucleico. Tras el inicio de la escisión de un resto fotosensible por irradiación con luz ultravioleta, una molécula modificada de azida-alquino más pequeña restante permite la amplificación.

50 La invención se explicará con más detalle en virtud de los ejemplos expuestos a continuación en el presente documento. Si bien se presenta al menos una realización a modo de ejemplo, debe apreciarse que existe una vasta cantidad de variaciones. También debe apreciarse que las realizaciones a modo de ejemplo son solo ejemplos, y no pretenden limitar el alcance, aplicabilidad o configuración de cualquier manera. Más bien, la descripción anterior proporcionará a los expertos en la materia las características esenciales de esta invención para implementar al menos una realización a modo de ejemplo, entendiéndose que pueden realizarse varios cambios sin apartarse del alcance como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

55 La Figura 1 muestra una representación esquemática de una realización del método. Una biblioteca de ADN modificada para comprender un grupo azida-alquino se incubó con una molécula diana. Después de la incubación, las secuencias no unidas se retiran y las moléculas unidas se recuperan. La molécula seleccionada se amplifica por PCR, usando una nucleobase modificada con alquino. El desplazamiento de una sola cadena se logra mediante digestión selectiva con exonucleasa lambda de una cadena. El ADN resultante se modifica nuevamente por cicloadición 1,3-dipolar de una azida RN<sub>3</sub>, reintroduciendo de esta manera la modificación química de un grupo azida-alquino. Esta biblioteca está nuevamente sujeta al ciclo de selección *in vitro* hasta que pueda detectarse un enriquecimiento de secuencias de unión a diana.

#### Detección de biomarcadores

65 Los aptámeros modificados por clic de la presente divulgación pueden usarse en diversos métodos para detectar la presencia o el nivel de uno o más biomarcadores en una muestra biológica, por ejemplo, entidades biológicas de

interés tales como proteínas, ácidos nucleicos o microvesículas. El aptámero puede funcionar como un agente de unión para evaluar la presencia o el nivel de la molécula diana relacionada. En diversas realizaciones de la divulgación dirigida a diagnósticos, pronósticos o tratanósticos, uno o más aptámeros se configuran en un ensayo basado en ligando-diana, donde uno o más aptámeros se ponen en contacto con una muestra biológica seleccionada para permitir que el o más aptámero se asocie o se una a sus moléculas diana. Los aptámeros se usan para identificar un perfil de múltiples biomarcadores (un perfil de "biomarcador") basándose en las muestras biológicas evaluadas y los biomarcadores detectados. Un perfil de biomarcador de una muestra biológica puede comprender una presencia, nivel u otra característica de uno o más biomarcadores de interés que pueden evaluarse, incluyendo sin limitación una presencia, nivel, secuencia, mutación, reordenamiento, translocación, deleción, modificación epigenética, metilación, modificación postraduccional, alelo, actividad, compañeros de complejos, estabilidad, vida media y similares.

Los perfiles de biomarcadores pueden usarse para evaluar criterios de diagnóstico y/o pronóstico como la presencia de enfermedad, estadificación de la enfermedad, monitorización de la enfermedad, estratificación de la enfermedad o vigilancia para la detección, metástasis o recurrencia o progresión de la enfermedad. Por ejemplo, los métodos que usan los aptámeros modificados por clic contra antígenos de superficie de microvesícula son útiles para correlacionar un perfil de biomarcador que comprende antígenos de microvesícula con una afección o enfermedad seleccionada. Un perfil de biomarcador también puede usarse clínicamente para tomar decisiones sobre las modalidades de tratamiento, incluyendo la intervención terapéutica. Un perfil de biomarcador puede usarse clínicamente para tomar decisiones de tratamiento, incluyendo si realizar una cirugía o qué normativas de tratamiento deben usarse junto con la cirugía (por ejemplo, antes de la cirugía o después de la cirugía). Como ejemplo ilustrativo, un perfil de biomarcador de biomarcadores circulantes que indique una forma agresiva de cáncer puede requerir un procedimiento quirúrgico más agresivo y/o un régimen terapéutico más agresivo para tratar al paciente.

Un perfil de biomarcador tal como se determina total o parcialmente usando un aptámero proporcionado en el presente documento puede usarse en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, para evaluar si un sujeto padece una enfermedad, está en riesgo de desarrollar la enfermedad o de evaluar la etapa o progresión de la enfermedad. Por ejemplo, un perfil de biomarcador puede usarse para evaluar si un sujeto tiene cáncer de próstata, cáncer de colon u otro cáncer como se describe en el presente documento. Adicionalmente, puede usarse un perfil de biomarcador para determinar una etapa de una enfermedad o afección.

Un perfil de biomarcador que comprende una microvesícula puede incluir la evaluación de la carga útil dentro de la microvesícula. Por ejemplo, puede usarse uno o más aptámeros modificados por clic para capturar una población de microvesículas usando un antígeno de superficie asociado a microvesículas específico, y después puede evaluarse el contenido de carga útil dentro de las microvesículas capturadas, proporcionando así una lectura adicional de biomarcadores del contenido de la carga útil.

## Fenotipos

Como se aprecia anteriormente, uno o más aptámeros modificados por clic pueden usarse para caracterizar un fenotipo de interés en una muestra. El término "fenotipo" como se usa en el presente documento puede significar cualquier rasgo o característica que se atribuye a un perfil de biomarcador que se identifica usando en parte o en su totalidad las composiciones y/o métodos de la presente divulgación. Por ejemplo, un fenotipo puede ser una determinación diagnóstica, pronóstica o tratanóstica basada en un perfil de biomarcador caracterizado para una muestra obtenida de un sujeto. Un fenotipo puede ser cualquier característica o rasgo observable de, tales como una enfermedad o afección, una fase de una enfermedad o afección, susceptibilidad a una enfermedad o afección, pronóstico de una fase de enfermedad o afección, un estado fisiológico o respuesta/respuesta potencial a la terapéutica. Un fenotipo puede ser el resultado de la composición genética de un sujeto, así como la influencia de factores ambientales y las interacciones entre los dos, así como de modificaciones epigenéticas a secuencias de ácido nucleico.

Un fenotipo en un sujeto puede caracterizarse obteniendo una muestra biológica de un sujeto y analizando la muestra usando uno o más aptámeros modificados con clic. Por ejemplo, caracterizar un fenotipo para un sujeto o individuo puede incluir detectar una enfermedad o afección (incluyendo la detección pre-sintomática en fase temprana), determinar un pronóstico, diagnóstico o tratanóstico de una enfermedad o afección, o determinar el estadio o la progresión de una enfermedad o afección. La caracterización de un fenotipo puede incluir la identificación de tratamientos apropiados o la efectividad del tratamiento para enfermedades específicas, afecciones, etapas de la enfermedad y etapas de la afección, predicciones y análisis de probabilidad de progresión de la enfermedad, particularmente recurrencia de la enfermedad, diseminación metastásica o recaída de la enfermedad. Un fenotipo también puede ser un tipo o subtipo clínicamente distinto de una afección o enfermedad, tales como un cáncer o un tumor. La determinación del fenotipo también puede ser una determinación de una afección fisiológica, o una evaluación de la angustia o el rechazo de los órganos, tales como el postrasplante. Las composiciones y métodos descritos en el presente documento permiten la evaluación de un sujeto de forma individual, que puede proporcionar beneficios de decisiones más eficientes y económicas en el tratamiento. Por ejemplo, los aptámeros modificados por clic pueden usarse en un ensayo para caracterizar un fenotipo.



La tratanosis incluye pruebas de diagnóstico que brindan la capacidad de afectar la terapia o el tratamiento de una enfermedad o estado de enfermedad. Las pruebas tratanósticas proporcionan una tratanosis de manera similar a las pruebas de diagnóstico o pronóstico que proporcionan un diagnóstico o pronóstico, respectivamente. Como se usa en el presente documento, la tratanóstica abarca cualquier forma deseada de prueba relacionada con la terapia, incluyendo medicina predictiva, medicina personalizada, medicina integrada, farmacodiagnóstico y asociación Dx/Rx. Las pruebas relacionadas con la terapia pueden usarse para predecir y evaluar la respuesta a medicamentos en sujetos individuales, es decir, para proporcionar medicina personalizada. La predicción de una respuesta farmacológica puede determinar si un sujeto es un respondedor probable o un no respondedor probable a un agente terapéutico candidato, por ejemplo, antes de que el sujeto haya sido expuesto o tratado con el tratamiento. Evaluar una respuesta de fármaco puede ser monitorizar una respuesta a un fármaco, por ejemplo, monitorizar la mejora del sujeto o la falta de ella en el transcurso del tiempo después de iniciar el tratamiento. Las pruebas relacionadas con la terapia son útiles para seleccionar un sujeto para el tratamiento que es particularmente probable que se beneficie del tratamiento o para proporcionar una indicación temprana y objetiva de la eficacia del tratamiento en un sujeto individual. De esta manera, El análisis que utiliza las composiciones y los métodos de la presente divulgación puede indicar que el tratamiento debe modificarse para seleccionar un tratamiento más prometedor, evitando así el gran gasto de retrasar el tratamiento beneficioso y evitando los costes financieros y de morbilidad de administrar un fármaco o fármacos ineficaces.

Los aptámeros modificados por clic pueden usarse para proporcionar una lectura tratanóstica, incluyendo sin limitación la predicción del estado de respondedor/no respondedor del sujeto, en donde un respondedor responde a un tratamiento para una enfermedad y un no respondedor no responde al tratamiento. Los biomarcadores tales como las proteínas y las microvesículas pueden analizarse en el sujeto y compararse con el de sujetos anteriores que se sabía que respondían o no a un tratamiento. Si el perfil del biomarcador en el sujeto se alinea más estrechamente con el de los sujetos anteriores que se sabía que respondían al tratamiento, el sujeto puede caracterizarse o predecirse, como respondedor al tratamiento. De manera similar, si el perfil del biomarcador en el sujeto se alinea más estrechamente con el de los sujetos anteriores que no respondieron al tratamiento, el sujeto puede caracterizarse o predecirse como no respondedor al tratamiento. El tratamiento puede ser para cualquier enfermedad apropiada, trastorno u otra afección, incluyendo sin limitación aquellos desvelados en el presente documento.

Un perfil de biomarcador para caracterizar un fenotipo puede comprender cualquier número de criterios útiles. Puede detectarse o identificarse un fenotipo en parte o en su totalidad usando las composiciones y/o métodos de la presente divulgación. En algunas realizaciones, se usa al menos un criterio para caracterizar un fenotipo de interés. En algunas realizaciones, se usan al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o al menos 100 criterios. Por ejemplo, para la caracterización de un cáncer, pueden usarse varios criterios diferentes cuando el sujeto es diagnosticado con un cáncer: 1) si la cantidad de un biomarcador en una muestra de un sujeto es más alta que un valor de referencia; 2) si la cantidad de un biomarcador dentro de células específicas, el tejido o derivados del mismo (por ejemplo, vesículas derivadas de un tejido u órgano específico) es más alta que un valor de referencia; o 3) si la cantidad de un biomarcador dentro de las vesículas con uno o más biomarcadores específicos de cáncer es más alta que un valor de referencia. Pueden aplicarse reglas similares si la cantidad de un biomarcador es menor o igual que la referencia. El método puede incluir además una medida de control de calidad, de tal manera que los resultados se proporcionen para el sujeto si las muestras cumplen con la medida de control de calidad. En algunas realizaciones, si se cumplen los criterios pero el control de calidad es cuestionable, el sujeto vuelve a evaluarse.

Los aptámeros modificados por clic pueden usarse para ayudar a caracterizar diversos fenotipos de interés. Por ejemplo, el fenotipo puede comprender detectar la presencia o la probabilidad de desarrollar un tumor, neoplasia, o cáncer, o caracterización del tumor, neoplasia o cáncer (por ejemplo, estadio, grado, agresividad, probabilidad de metástasis o recurrencia, etc.). Los fenotipos a modo de ejemplo se presentan a continuación.

El fenotipo puede ser una condición premaligna, tales como queratosis actínica, gastritis atrófica, leucoplasia, eritroplasia, Granulomatosis linfomatoide, preleucemia, fibrosis, displasia cervical, displasia cervical uterina, xeroderma pigmentoso, esófago de Barrett, pólipo colorrectal u otro crecimiento o lesión anormal del tejido que probablemente se convierta en un tumor maligno. Las infecciones víricas transformadoras tales como el VIH y el VPH también presentan fenotipos que pueden evaluarse.

Un cáncer caracterizado por los métodos de la presente divulgación puede comprender, sin limitación, un carcinoma, un sarcoma, un linfoma o leucemia, un tumor de células germinales, un blastoma u otros tipos de cáncer. Los carcinomas incluyen sin limitación neoplasias epiteliales, neoplasias de células escamosas, carcinoma de células escamosas, neoplasias de células basales, carcinoma de células basales, papilomas y carcinomas de células transicionales, adenomas y adenocarcinomas (glándulas), adenoma, adenocarcinoma, linitis plásica insulina, glucagonoma, gastrinoma, vipoma, colangiocarcinoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma adenoideo quístico, tumor carcinoide del apéndice, prolactinoma, oncocitoma, adenoma de células de Hurthle, carcinoma de células renales, tumor de Grawitz, adenomas endocrinos múltiples, adenoma endometrioide, neoplasias anexiales y del apéndice de la piel, neoplasias mucoepidermoides, neoplasias quísticas, mucinosas y serosas, quistadenoma,

- pseudomixoma peritoneal, neoplasias ductales, lobulares y medulares, neoplasias de células acinares, neoplasias epiteliales complejas, tumor de Warthin, timoma, neoplasias gonadal especializadas, tumor del estroma del cordón sexual, tecoma, tumor de células de la granulosa, arrenoblastoma, tumor de células de Sertoli Leydig, tumores del glomus, paraganglioma, feocromocitoma, tumor del glomus, nevos y melanomas, nevo melanocítico, melanoma maligno, melanoma, melanoma nodular, nevo displásico, léntigo, melanoma maligno, melanoma de extensión superficial y melanoma lentiginoso acral maligno. El sarcoma incluye sin limitación tumor de Askin, botrioides, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, hemangio endotelioma maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma, sarcomas de tejidos blandos que incluyen: sarcoma alveolar de las partes blandas, angiosarcoma, cistosarcoma filodes, dermatofibrosarcoma, tumor desmoide, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, sarcoma epiteliode, condrosarcoma extraesquelético, osteosarcoma extraesquelético, fibrosarcoma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, linfofibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, neurofibrosarcoma, rhabdomiomas y sinovialesarcoma. El linfoma y la leucemia incluyen sin limitación leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma linfoplasmacítico (tal como macroglobulinemia de Waldenström), linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, enfermedades de deposición de inmunoglobulina monoclonal, enfermedades de la cadena pesada, linfoma de linfocitos B de la zona marginal extranodal, también denominado linfoma de Malta, linfoma nodal de la zona marginal de linfocitos B (nmz1), linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma mediastínico (tímico) de linfocitos B grandes, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de derrame primario, linfoma/leucemia de Burkitt, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfocítica granular de linfocitos T grandes, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de linfocitos T adultos (ATL), linfoma extraganglionar de células NK/T, linfoma de linfocitos T de tipo nasal, de tipo enteropatía, linfoma hepatoesplénico de linfocitos T, linfoma blástico de células NK, micosis fungoide/síndrome de Sezary, trastornos linfoproliferativos de células T CD30 positivas cutáneas primarias, linfoma anaplásico cutáneo primario de células grandes, papulosis linfomatoide, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma de linfocitos T periféricos, linfoma de células grandes anaplásicas no especificadas, linfomas de Hodgkin clásicos (esclerosis nodular, celularidad mixta, rico en linfocitos, linfocitos empobrecidos o no) y linfoma de Hodgkin con predominio linfocítico nodular. Los tumores de células germinales incluyen sin limitación germinoma, disgerminoma, seminoma, tumor de células germinales no germinomatosas, carcinoma embrionario, turbulencia de seno endodérmico, coriocarcinoma, teratoma, polyembrioma y gonadoblastoma. El blastoma incluye sin limitación nefroblastoma, meduloblastoma y retinoblastoma. Otros cánceres incluyen sin limitación carcinoma labial, carcinoma de laringe, carcinoma de hipofaringe, carcinoma de lengua, carcinoma de las glándulas salivales, carcinoma gástrico, adenocarcinoma, cáncer de tiroides (carcinoma medular y papilar de tiroides), carcinoma renal, carcinoma de parénquima renal, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de cuerpo uterino, carcinoma de endometrio, carcinoma coriónico, carcinoma de testículo, carcinoma urinario, melanoma, tumores cerebrales, tales como glioblastoma, astrocitoma, meningioma, meduloblastoma y tumores neuroectodérmicos periféricos, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma bronquial, mieloma múltiple, basalioma, teratoma, retinoblastoma, melanoma de coroides, seminoma, rhabdomiomas, craneofaringoma, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Ewing y plasmocitoma.
- En realizaciones, el cáncer comprende una leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma adrenocortical; cánceres relacionados con SIDA; linfoma relacionado con SIDA; cáncer anal; cáncer del apéndice; astrocitomas; tumor rabdoide/teratoide atípico; carcinoma de células basales; cáncer de vejiga; glioma del tronco encefálico; tumor cerebral (incluyendo glioma del tronco encefálico, tumor teratoide/rabdoide atípico del sistema nervioso central, tumores embrionarios del sistema nervioso central, astrocitomas, craneofaringioma, ependimoblastoma, ependimoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineoblastoma); cáncer de mama; tumores bronquiales; linfoma de Burkitt; cáncer de sitio primario desconocido; tumor carcinoide; carcinoma de sitio primario desconocido; tumor teratoide/rabdoide atípico del sistema nervioso central; tumores embrionarios del sistema nervioso central; cáncer de cuello uterino; cánceres en la infancia; cordoma; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; trastornos crónicos mieloproliferativos; cáncer de colon; cáncer colorrectal; craneofaringioma; linfoma cutáneo de linfocitos T; tumores endocrinos de células de los islotes del páncreas; cáncer endometrial; ependimoblastoma; ependimoma; cáncer de esófago; esteseoneumoblastoma; sarcoma de Ewing; tumor de células germinales extracraneales; tumor de células germinales extragonadales; cáncer del conducto biliar extrahepático; cáncer de vesícula biliar; cáncer gástrico (estómago); tumor carcinoide gastrointestinal; tumor de células del estroma gastrointestinal; tumor del estroma gastrointestinal (TEGI); tumor trofoblástico gestacional; glioma; tricoleucemia; cáncer de cabeza y cuello; cáncer cardíaco; Linfoma de Hodgkin; cáncer hipofaríngeo; melanoma intraocular; tumores de células de los islotes; Sarcoma de Kaposi; cáncer de riñón; histiocitosis de células de Langerhans; cáncer de laringe; cáncer de labios; cáncer de hígado; histiocitoma fibroso maligno, cáncer de hueso; meduloblastoma; meduloepitelioma; melanoma; carcinoma de células de Merkel; carcinoma de piel de células de Merkel; mesotelioma; cáncer de cuello escamoso metastásico con primario oculto; cáncer de boca; síndromes múltiples de neoplasia endocrina; mieloma múltiple; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; micosis fungoide; síndromes mielodisplásicos; neoplasias mieloproliferativas; cáncer de la cavidad nasal; cáncer nasofaríngeo; neuroblastoma; Linfoma no hodgkiniano; cáncer de piel no melanoma; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer oral; cáncer de la cavidad oral; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma; otros tumores cerebrales y medulares; cáncer de ovario; cáncer epitelial de ovario; tumor de células germinales ováricas; tumor ovárico de bajo potencial maligno; cáncer de páncreas; papilomatosis; cáncer de seno paranasal; cáncer paratiroideo; cáncer

pélvico; cáncer de pene; cáncer faríngeo; tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia; pineoblastoma; tumor de la pituitaria; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple; blastoma pleuropulmonar; linfoma primario del sistema nervioso central (SNC); cáncer primario de hígado hepatocelular; cáncer de próstata; cáncer rectal; cáncer renal; cáncer de células renales (riñón); cáncer de células renales; cáncer del tracto respiratorio; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer de glándula salival; síndrome de Sézary; cáncer microcítico de pulmón; cáncer del intestino delgado; sarcoma de tejidos blandos; carcinoma de células escamosas; cáncer de cuello escamoso; cáncer de estómago (gástrico); tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; linfoma de linfocitos T; cáncer testicular; cáncer de garganta; carcinoma tímico; timoma; cáncer de tiroides; cáncer de células transicionales; cáncer de células transicionales de la pelvis renal y el uréter; tumor trofoblástico; cáncer del uréter; cáncer de la uretra; cáncer de útero; sarcoma uterino; cáncer de vagina; cáncer de vulva; macroglobulinemia de Waldenstrom; o tumor de Wilm.

En algunas realizaciones, el cáncer comprende una leucemia mieloide aguda (AML), carcinoma de mama, colangiocarcinoma, adenocarcinoma colorrectal, adenocarcinoma de conducto biliar extrahepático, malignidad del tracto genital femenino, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma gastroesofágico, tumores estromales gastrointestinales (GIST), glioblastoma, carcinoma escamoso de cabeza y cuello, leucemia, carcinoma hepatocelular de hígado, glioma de bajo grado, carcinoma bronquioloalveolar pulmonar (BAC), cáncer de pulmón de células pulmonares no microcíticas (CPNM), cáncer de pulmón de células microcíticas (SCLC), linfoma, malignidad del tracto genital masculino, tumor fibroso solitario maligno de la pleura (MSFT), melanoma, mieloma múltiple, tumor neuroendocrino, linfoma difuso nodal de linfocitos B grandes, cáncer de ovario no epitelial (no EOC), carcinoma epitelial de superficie ovárica, adenocarcinoma pancreático, carcinomas pituitarios, oligodendroglioma, adenocarcinoma de próstata, carcinoma retroperitoneal o peritoneal, sarcoma retroperitoneal o peritoneal, malignidad del intestino delgado, tumor de tejido blando, carcinoma tímico, carcinoma de tiroides o melanoma uveal. El aptámero modificado con clic de la presente divulgación puede usarse para caracterizar estos y otros cánceres.

De esta manera, caracterizar un fenotipo puede proporcionar un diagnóstico, pronóstico o tratánóstico de uno de los cánceres desvelados en el presente documento.

El fenotipo también puede ser una enfermedad inflamatoria, enfermedad inmune o enfermedad autoinmune. Por ejemplo, la enfermedad puede ser enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU), inflamación pélvica, vasculitis, psoriasis, diabetes, hepatitis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, Miastenia Grave, diabetes de tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de espondilitis anquilosante de Sjogrens, síndrome de CREST, esclerodermia, enfermedad reumática, rechazo de órganos, Colangitis esclerosante primaria o sepsis.

El fenotipo también puede comprender una enfermedad cardiovascular, tales como aterosclerosis, insuficiencia cardíaca congestiva, placa vulnerable, accidente cerebrovascular o isquemia. La enfermedad o afección cardiovascular puede ser presión arterial alta, estenosis, oclusión de vasos o un evento trombotico.

El fenotipo también puede comprender una enfermedad neurológica, tales como esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Alzheimer (EA), esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión, autismo, enfermedad priónica, enfermedad de Pick, demencia, enfermedad de Huntington (EH), síndrome de Down, enfermedad cerebrovascular, encefalitis de Rasmussen, meningitis vírica, lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico (NPSLE), esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, encefalopatía esponjiforme transmisible, daño por reperusión isquémica (por ejemplo, accidente cerebrovascular), trauma cerebral, infección microbiana o síndrome de fatiga crónica.

El fenotipo también puede ser una afección tales como fibromialgia, dolor neuropático crónico o dolor neuropático periférico.

El fenotipo también puede comprender una enfermedad infecciosa, tales como una infección bacteriana, vírica o de levadura. Por ejemplo, la enfermedad o afección puede ser enfermedad de Whipple, enfermedad priónica, cirrosis, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, VIH, hepatitis, sífilis, meningitis, malaria, tuberculosis o gripe. Las proteínas víricas, tales como el VIH o las partículas similares al VHC pueden evaluarse en una vesícula, para caracterizar una afección vírica.

El fenotipo también puede comprender una afección perinatal o relacionada con el embarazo (por ejemplo, preeclampsia o parto prematuro), enfermedad o afección metabólica, tales como una enfermedad metabólica o afección asociada al metabolismo del hierro. Por ejemplo, la hepcidina puede analizarse en una vesícula para caracterizar una deficiencia de hierro. La enfermedad o afección metabólica también puede ser diabetes, inflamación o una afección perinatal.

Los aptámeros modificados por clic pueden usarse para caracterizar estas y otras enfermedades y trastornos que pueden evaluarse mediante biomarcadores, por ejemplo, evaluando un biomarcador usando un aptámero modificado con clic. De esta manera, caracterizar un fenotipo puede proporcionar un diagnóstico, pronóstico o tratánóstico de una de las enfermedades y trastornos desvelados en el presente documento.

## Sujeto

5 Pueden determinarse uno o más fenotipos de un sujeto analizando un perfil de biomarcador en una muestra biológica obtenida del sujeto. Un sujeto, pero no se limita a, mamíferos tales como animales bovinos, aves, caninos, equinos, felinos, ovinos, porcinos o primates (incluyendo humanos y primates no humanos). Un sujeto también puede incluir un mamífero importante por estar en peligro de extinción, tales como un tigre siberiano; o de importancia económica, tales como un animal criado en una granja para consumo humano, o un animal de importancia social para los humanos, tales como un animal mantenido como mascota o en un zoológico. Algunos ejemplos de tales animales incluyen, pero no se limitan a, carnívoros tales como gatos y perros; porcinos incluyendo cerdos, puercos y jabalíes; rumiantes o ungulados tales como ganado vacuno, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes, camellos o caballos. También se incluyen aves en peligro de extinción o mantenidas en zoológicos, así como las aves y más particularmente las aves domesticadas, es decir, aves de corral, tales como pavos y pollos, patos, gansos, gallina de Guinea. También se incluyen cerdos y caballos domesticados (incluyendo caballos de carreras). Además, también se incluye cualquier especie animal relacionada con actividades comerciales tales como los animales relacionados con la agricultura y la acuicultura y otras actividades en las que la monitorización de enfermedades, el diagnóstico y la selección de la terapia son prácticas rutinarias en la cría para la productividad económica y/o seguridad de la cadena alimenticia.

20 El sujeto puede tener una enfermedad o afección preexistente, tales como cáncer u otra enfermedad o trastorno listado en el presente documento (véase, por ejemplo, la sección "Fenotipos"). Alternativamente, el sujeto puede no tener ninguna afección preexistente conocida. El sujeto también puede no responder a un tratamiento existente o pasado, tales como un tratamiento para el cáncer.

## 25 Muestras

Una muestra puede incluir cualquier muestra biológica relevante que pueda usarse para la evaluación de biomarcadores usando un aptámero modificado con un clic, incluyendo sin limitación secciones de tejidos tales como biopsias o tejidos extraídos durante procedimientos quirúrgicos u otros, fluidos corporales, muestras de autopsia, secciones congeladas tomadas con fines histológicos y cultivos celulares. Dichas muestras incluyen sangre y fracciones o productos sanguíneos (por ejemplo, suero, capa leucocitaria, plasma, plaquetas, eritrocitos, y similares), esputo, derrame maligno, tejido de células de la mejilla, células cultivadas (por ejemplo, cultivos primarios, explantes y células transformadas), deposición, orina, otros fluidos biológicos o corporales (por ejemplo, fluido prostático, fluido gástrico, fluido intestinal, fluido renal, fluido pulmonar, líquido cefalorraquídeo y similares), etc. La muestra puede comprender material biológico que es un bloque fresco embebido en parafina fijada con formalina (FFPE), parafina fijada con formalina embebida, o está dentro de un ARN conservante + fijador de formalina. Puede usarse más de una muestra de más de un tipo para cada paciente.

40 La muestra usada en los métodos descritos en el presente documento puede ser una muestra embebida en parafina fijada en formalina (FFPE). La muestra de FFPE puede ser uno o más de tejido fijado, portaobjetos sin teñir, núcleo o coágulo de médula ósea, biopsia con aguja gruesa, fluidos malignos y aspiración con aguja fina (FNA). En una realización, el tejido fijo comprende un tumor que contiene un bloque embebido en parafina fijada en formalina (FFPE) de una cirugía o biopsia. En otra realización, los portaobjetos sin teñir comprenden portaobjetos sin teñir, cargados, sin cocer de un bloque de parafina. En otra realización, El núcleo o coágulo de la médula ósea comprende un núcleo descalcificado. Un núcleo fijado y/o coágulo de formalina puede estar embebido en parafina. En otra realización más, la biopsia con aguja gruesa comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, por ejemplo, 3-4, muestras de biopsia embebidas en parafina. Puede usarse una biopsia con aguja de calibre 18. El fluido maligno puede comprender un volumen suficiente de líquido pleural/ascítico fresco para producir un sedimento celular de 5x5x2 mm. El líquido puede fijarse con formalina en un bloque de parafina. En una realización, la biopsia con aguja gruesa comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, por ejemplo, 4-6, aspirados embebidos en parafina.

Una muestra puede procesarse de acuerdo con técnicas entendidas por los expertos en la materia. Una muestra puede ser, sin limitación, células o tejidos frescos, congelados o fijados. En algunas realizaciones, una muestra comprende tejido embebido en parafina fijado con formalina (FFPE), tejido fresco o tejido fresco congelado (FF). Una muestra puede comprender células cultivadas, incluyendo líneas celulares primarias o inmortalizadas derivadas de una muestra objeto. Una muestra también puede referirse a un extracto de una muestra de un sujeto. Por ejemplo, una muestra puede comprender ADN, ARN o proteína extraída de un tejido o un fluido corporal. Muchas técnicas y kits comerciales están disponibles para tales fines. La muestra fresca del individuo puede tratarse con un agente para preservar el ARN antes de su posterior procesamiento, por ejemplo, lisis y extracción celular. Las muestras pueden incluir muestras congeladas recolectadas para otros fines. Las muestras pueden asociarse a información relevante tales como la edad, el género y los síntomas clínicos presentes en el sujeto; la fuente de la muestra; y los métodos de recolección y almacenamiento de la muestra. Puede obtenerse una muestra de un sujeto.

65 Una biopsia comprende el proceso de extracción de una muestra de tejido para evaluación diagnóstica o pronóstica, y el espécimen de tejido en sí. Cualquier técnica de biopsia conocida en la técnica puede aplicarse a los métodos de perfil de biomarcadores de la presente descripción. La técnica de biopsia aplicada puede depender del tipo de tejido

a evaluar (por ejemplo, colon, próstata, riñón, vejiga, ganglio linfático, hígado, médula ósea, célula sanguínea, pulmón, mama, etc.), El tamaño y tipo de tumor (por ejemplo, sólido o suspendido, sangre o ascitis), entre otros factores. Las técnicas representativas de biopsia incluyen, pero no se limitan a, biopsia por escisión, biopsia incisional, biopsia con aguja, biopsia quirúrgica y biopsia de médula ósea. Una "biopsia por escisión" se refiere a la extirpación de una masa tumoral completa con un pequeño margen de tejido normal que la rodea. Una "biopsia incisional" se refiere a la extracción de una cuña de tejido que incluye un diámetro de sección transversal del tumor. El perfil molecular puede usar una "biopsia con aguja gruesa" de la masa tumoral o una "biopsia por aspiración con aguja fina" que generalmente obtiene una suspensión de células dentro de la masa tumoral.

Se discuten las técnicas de biopsia, por ejemplo, en Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper, et al., eds., 16a ed., 2005, Capítulo 70, y a lo largo de la Parte V.

Las técnicas convencionales de biología molecular conocidas en la técnica y no descritas específicamente se siguen generalmente como en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989) y como en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989) y como en Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, Nueva York (1988) y como en Watson et al., Recombinant DNA, Scientific American Books, Nueva York y en Birren et al (eds) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vol. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998) y la metodología establecida en las Pat. de EE.UU. N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede llevarse a cabo generalmente como en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

La muestra biológica evaluada usando las composiciones y los métodos puede ser cualquier fluido corporal o biológico útil, incluyendo pero no limitado a sangre periférica, sueros, plasma, ascitis, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), esputo, saliva, médula ósea, líquido sinovial, humor acuoso, líquido amniótico, cerumen, leche materna, líquido de lavado broncoalveolar, semen (incluyendo fluido prostático), Fluido de Cowper o líquido preeyaculatorio, eyaculación femenina, sudor, materia fecal, cabello, lágrimas, fluido quístico, líquido pleural y peritoneal, fluido pericárdico, linfa, quimo, quile, bilis, líquido intersticial, menstruado, pus, sebo, vómito, secreciones vaginales, secreción mucosa, agua fecal, jugo pancreático, líquidos de lavado de cavidades sinusales, aspirados broncopulmonares u otros fluidos de lavado, células, cultivo celular, o un sobrenadante de cultivo celular. Una muestra biológica también puede incluir la cavidad de blastocilo, sangre del cordón umbilical o circulación materna que puede ser de origen fetal o materno. La muestra biológica también puede ser un cultivo celular, muestra de tejido o biopsia a partir de la cual pueden obtenerse vesículas y otros biomarcadores circulantes. Por ejemplo, pueden cultivarse células de interés y pueden aislarse vesículas u otros biomarcadores del cultivo. En diversas realizaciones, los perfiles de biomarcadores pueden evaluarse directamente a partir de tales muestras biológicas (por ejemplo, identificación de presencia o niveles de biomarcadores de ácido nucleico o polipéptido o fragmentos funcionales de los mismos) usando diversos métodos, tales como la extracción de moléculas de ácido nucleico de la sangre, plasma, suero o cualquiera de las muestras biológicas anteriores, uso de matrices de proteínas o anticuerpos para identificar biomarcadores de polipéptidos (o fragmentos funcionales), así como otras técnicas de matrices, secuenciación, PCR y proteómica conocidas en la técnica para la identificación y evaluación de moléculas de ácido nucleico y polipéptido. Además, Uno o más componentes presentes en tales muestras pueden aislarse o enriquecerse primero y procesarse adicionalmente para evaluar la presencia o los niveles de biomarcadores seleccionados, para evaluar un perfil de biomarcador dado (por ejemplo, microvesículas aisladas antes del perfil para biomarcadores de proteínas y/o ácidos nucleicos).

La **Tabla 1** presenta una lista no limitante de enfermedades, afecciones o estados biológicos y muestras biológicas correspondientes que pueden usarse para análisis de acuerdo con los métodos de la presente divulgación.

**Tabla 1: Ejemplos de muestras biológicas**

Enfermedad, afección o estado biológico ilustrativos	Muestras biológicas ilustrativas
<p><i>Cánceres/neoplasias que afectan a los siguientes tipos de tejidos/sistemas corporales:</i> mama, pulmón, ovario, colon, rectal, próstata, pancreático, cerebro, hueso, tejido conectivo, glándulas, piel, linfa, sistema nervioso, endocrino, célula germinal, genitourinario, hematológico/sangre, médula ósea, músculo, ojo, esofágico, tejido graso, tiroides, pituitaria, médula espinal, conducto biliar, corazón, vesícula biliar, vejiga, testículos, cervical, endometrio, renal, ovario, digestivo/gastrointestinal, estómago, cabeza y cuello, hígado, leucemia, respiratorio/torácico, cánceres de primario desconocido (CUP)</p>	<p>Tumor, sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, esputo, ascitis, líquido sinovial, semen, aspirados del pezón, saliva, líquido de lavado broncoalveolar, lágrimas, lavados orofaríngeos, heces, líquidos peritoneales, derrame pleural, sudor, lágrimas, humor acuoso, fluido pericárdico, linfa, quimo, quile, bilis, agua fecal, líquido amniótico, leche materna, jugo pancreático, cerumen, Fluido de Cowper o líquido preeyaculatorio, eyaculación femenina, líquido intersticial, menstruado, moco, pus, sebo, lubricación vaginal, vómito</p>

50

(continuación)

<b>Enfermedad, afección o estado biológico ilustrativos</b>	<b>Muestras biológicas ilustrativas</b>
<i>Trastornos neurodegenerativos/neurológicos:</i> enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple, esquizofrenia y trastorno bipolar, trastornos de espasticidad, epilepsia	Sangre, suero, plasma, LCR, orina
<i>Enfermedad cardiovascular:</i> aterosclerosis, cardiomiopatía, endocarditis, placas vulnerables, infección	Sangre, suero, plasma, LCR, orina
<i>Accidente cerebrovascular:</i> hemorragia isquémica, intracerebral, hemorragia subaracnoidea, ataques isquémicos transitorios (TIA)	Sangre, suero, plasma, LCR, orina
<i>Trastornos del dolor:</i> dolor neuropático periférico y dolor neuropático crónico y fibromialgia,	Sangre, suero, plasma, LCR, orina
<i>Enfermedad autoinmune:</i> enfermedades sistémicas y localizadas, enfermedad reumática, Lupus, Síndrome de Sjogren	Sangre, suero, plasma, LCR, orina, líquido sinovial
<i>Anomalías del sistema digestivo:</i> esófago de Barrett, síndrome de intestino irritable, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, Diverticulosis y Diverticulitis, Enfermedad celíaca	Sangre, suero, plasma, LCR, orina
<i>Trastornos endocrinos:</i> diabetes mellitus, diversas formas de tiroiditis, trastornos suprarrenales, trastornos de la hipófisis	Sangre, suero, plasma, LCR, orina
<i>Enfermedades y trastornos de la piel:</i> psoriasis	Sangre, suero, plasma, LCR, orina, líquido sinovial, lágrimas
<i>Trastornos urológicos:</i> hipertrofia prostática benigna (BPH), enfermedad renal poliquística, cistitis intersticial	Sangre, suero, plasma, orina
<i>Enfermedad/lesión hepática:</i> Cirrosis, hepatotoxicidad inducida (debido a la exposición a fuentes químicas naturales o sintéticas)	Sangre, suero, plasma, orina
<i>Enfermedad/lesión renal:</i> afecciones agudas, subagudas, crónicas, Lesión por podocitos, glomeruloesclerosis focal y segmentaria	Sangre, suero, plasma, orina
Endometriosis	Sangre, suero, plasma, orina, fluidos vaginales
Osteoporosis	Sangre, suero, plasma, orina, líquido sinovial
Pancreatitis	Sangre, suero, plasma, orina, jugo pancreático
Asma	Sangre, suero, plasma, orina, esputo, líquido de lavado bronquiolar
Alergias	Sangre, suero, plasma, orina, esputo, líquido de lavado bronquiolar
Enfermedades relacionadas con priones	Sangre, suero, plasma, LCR, orina
<i>Infecciones víricas:</i> VIH/SIDA	Sangre, suero, plasma, orina
Septicemia	Sangre, suero, plasma, orina, lágrimas, lavado nasal
Rechazo/trasplante de órganos	Sangre, suero, plasma, orina, diversos fluidos de lavado
<i>Afecciones diferenciadoras:</i> adenoma frente a pólipo hiperplásico, síndrome del intestino irritable (SII) frente a normal, clasificando las etapas de Dukes A, B, C y/o D de cáncer de colon, adenoma con hiperplasia de bajo grado frente a hiperplasia de alto grado, adenoma frente a normal, cáncer colorrectal frente a normal, IBS frente a, colitis ulcerosa (CU) frente a enfermedad de Crohn (EC),	Sangre, suero, plasma, orina, esputo, heces, líquido de lavado colónico
<i>Estados, afecciones o enfermedades afiliadas relacionados con el embarazo:</i> riesgo genético, resultados adversos del embarazo	Suero materno, plasma, líquido amniótico, sangre de cordón umbilical

- 5 El perfil de biomarcador obtenido usando uno o más aptámeros modificados por clic puede derivar de una muestra de sangre o derivado de sangre. Los derivados de sangre comprenden plasma y suero. El plasma sanguíneo es el componente líquido de la sangre completa y constituye aproximadamente el 55 % del volumen sanguíneo total. Se compone principalmente de agua con pequeñas cantidades de minerales, sales, iones, nutrientes y proteínas en solución. En sangre entera, los glóbulos rojos, los leucocitos y las plaquetas se suspenden dentro del plasma. El suero sanguíneo se refiere al plasma sanguíneo sin fibrinógeno u otros factores de coagulación (es decir, sangre completa menos las células y los factores de coagulación).
- 10 Adicionalmente, una muestra biológica puede comprender una vesícula o un fragmento de membrana celular que

deriva de una célula de origen y está disponible extracelularmente en un fluido biológico o medio extracelular.

Puede usarse uno o más aptámeros modificados con clic para detectar una microvesícula. Una microvesícula, como se usa en el presente documento, comprende vesículas de membrana que se desprenden de las células. Las  
5 microvesículas o vesículas de membrana incluyen sin limitación: microvesículas circulantes (cMV), vesícula, exosoma, nanovesícula, dexosoma, vesiculación, ampolla, prostasoma, micropartícula, vesícula intralumenal, fragmento de membrana, vesícula endosómica intralumenal, vesícula de tipo endosómica, vehículo de exocitosis, vesícula de endosoma, vesícula endosómica, cuerpo apoptótico, cuerpo multivesicular, vesícula secretora, vesícula  
10 de fosfolípidos, vesícula liposómica, argosoma, texasoma, secresoma, tolerosoma, melanosoma, oncosoma o vehículo excitado. Adicionalmente, aunque las microvesículas pueden producirse por diferentes procesos celulares, los métodos de la invención no se limitan ni dependen de ningún mecanismo, en la medida en que tales microvesículas estén presentes en una muestra biológica y puedan caracterizarse por los métodos desvelados en el presente documento. A menos que se especifique otra cosa, los métodos que hacen uso de una especie de  
15 microvesícula pueden aplicarse a otros tipos de microvesículas. Las microvesículas generalmente comprenden estructuras esféricas con una bicapa lipídica similar a las membranas celulares que rodea una luz interna que puede contener componentes solubles, a veces denominados carga útil. En algunas realizaciones, los métodos de la presente divulgación hacen uso de exosomas, que son pequeñas vesículas secretadas de aproximadamente 40-100 nm de diámetro. Para una revisión de vesículas de membrana, incluyendo tipos y caracterizaciones, véase Thery et al., Nat Rev Immunol. Ago 2009;9(8):581-93. Algunas propiedades de diferentes tipos de vesículas incluyen aquellas  
20 en la **Tabla 2**:

Tabla 2: Propiedades de vesículas

Rasgo	Exosomas	Microvesículas	Ectosomas	Partículas de membrana	Vesículas tipo exosoma	Vesículas apoptóticas
Tamaño	50-100 nm	100-1.000 nm	50-200 nm	50-80 nm	20-50 nm	50-500 nm
Densidad en sacarosa	1,13-1,19 g/ml			1,04-1,07 g/ml	1,1 g/ml	1,16-1,28 g/ml
Apariencia EM	Forma de copa	Forma irregular, denso en electrones	Estructuras redondas bilamelares	Redonda	Forma irregular	Heterogéneo
Sedimentación	100.000 g	10.000 g	160.000-200.000 g	100.000-200.000 g	175.000 g	1.200 g, 10.000 g, 100.000 g
Composición lipídica	Enriquecido en colesterol, esfingomielina y ceramida; contiene balsas lipídicas; expone PPS	Expone PPS	Enriquecido en colesterol y diacilglicerol; expone PPS		Sin balsas lipídicas	
Principales marcadores proteicos	Tetraspaninas (por ejemplo, CD63, CD9), Alix, TSG101	Integrinas, selectinas y ligando CD40	CR1 y enzimas proteolíticas; sin CD63	CD133; sin CD63	TNFR1	Histonas
Origen intracelular	Compartimentos internos (endosomas)	Membrana de plasma	Membrana de plasma	Membrana de plasma		

Abreviaturas: fosfatidilserina (PPS); microscopía electrónica (EM)



Las microvesículas incluyen partículas unidas a la membrana desprendida, o "micropartículas", que derivan de la membrana plasmática o de una membrana interna. Las microvesículas pueden liberarse desde las células hacia el entorno extracelular. Las células que liberan microvesículas incluyen, sin limitación, células que se originan de, o que derivan de, el ectodermo, el endodermo o el mesodermo. Las células pueden haber sufrido variaciones o alteraciones genéticas, ambientales y/o cualquier otra. Por ejemplo, las células pueden ser células tumorales. Una microvesícula puede reflejar cualquier cambio en la célula de origen y, por lo tanto, reflejar los cambios en las células originarias, por ejemplo, células que tienen diversas mutaciones genéticas. En un mecanismo, se genera una microvesícula por vía intracelular cuando un segmento de la membrana celular se invagina espontáneamente y finalmente se exocita (véase, por ejemplo, Keller et al., *Immunol. Lett.* 107 (2): 102-8 (2006)). Las microvesículas también incluyen estructuras derivadas de células unidas por una membrana de bicapa lipídica que surge tanto de la evacuación herniada (ampollas) separación como del sellado de porciones de la membrana plasmática o de la exportación de cualquier estructura vesicular unida a la membrana intracelular que contiene varias proteínas de origen tumoral asociadas a la membrana, incluyendo moléculas unidas a la superficie derivadas de la circulación del hospedador que se unen selectivamente a las proteínas derivadas del tumor junto con las moléculas contenidas en la luz de la microvesícula, incluyendo pero no limitado a microARN derivados de tumores o proteínas intracelulares. Las vesiculaciones y ampollas se describen más detalladamente en Charras et al., *Nature Reviews Molecular and Cell Biology*, Vol. 9, N.º 11, p. 730-736 (2008). Una microvesícula expulsada a la circulación o fluidos corporales de las células tumorales puede denominarse una "microvesícula derivada de tumor circulante". Cuando dicha microvesícula es un exosoma, puede denominarse exosoma derivado de tumor circulante (CTE). En algunos casos, una microvesícula puede derivar de una célula de origen específica. El CTE, como con una microvesícula específica de célula de origen, normalmente tiene uno o más biomarcadores únicos que permiten el aislamiento del CTE o la microvesícula específica de la célula de origen, por ejemplo, de un fluido corporal y algunas veces de manera específica. Por ejemplo, se usan marcadores específicos de una célula o tejido para identificar la célula de origen. En el presente documento se desvelan ejemplos de dichos marcadores específicos de células o tejidos y puede accederse a ellos en la Base de datos Tissue-specific Gene Expression and Regulation (TiGER), disponible en [bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/](http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/); Liu et al. (2008) TiGER: a database for tissue-specific gene expression and regulation. *BMC Bioinformatics.* 9:271; TissueDistributionDBs, disponible en [genome.dkfz-heidelberg.de/menu/tissue\\_db/index.html](http://genome.dkfz-heidelberg.de/menu/tissue_db/index.html).

Una microvesícula puede tener un diámetro mayor de aproximadamente 10 nm, 20 nm o 30 nm. Una microvesícula puede tener un diámetro mayor de 40 nm, 50 nm, 100 nm, 200 nm, 500 nm, 1000 nm, 1500 nm, 2000 nm o más de 10.000 nm. Una microvesícula puede tener un diámetro de aproximadamente 20-2000 nm, aproximadamente 20-1500 nm, aproximadamente 30-1000 nm, aproximadamente 30-800 nm, aproximadamente 30-200 nm o aproximadamente 30-100 nm. En algunas realizaciones, la microvesícula tiene un diámetro de menos de 10.000 nm, 2000 nm, 1500 nm, 1000 nm, 800 nm, 500 nm, 200 nm, 100 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, 20 nm o menos de 10 nm. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" en referencia a un valor numérico significa que las variaciones del 10 % por encima o por debajo del valor numérico están dentro del intervalo atribuido al valor especificado. Los tamaños típicos para diversos tipos de microvesículas se muestran en la **Tabla 2**. Las microvesículas pueden evaluarse para medir el diámetro de una sola microvesícula o cualquier cantidad de microvesículas. Por ejemplo, puede determinarse el intervalo de diámetros de una población de microvesículas o un diámetro promedio de una población de microvesículas. El diámetro de la microvesícula puede evaluarse utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tecnologías de formación de imagen tales como la microscopía electrónica. En una realización, se determina un diámetro de una o más microvesículas usando detección de partículas ópticas. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 7.751.053, titulada "Optical Detection and Analysis of Particles" y publicada el 6 de julio de 2010; y la Patente de EE.UU. 7.399.600, titulada "Optical Detection and Analysis of Particles" y publicada el 15 de julio de 2010.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente divulgación comprenden evaluar microvesículas directamente, como en una muestra biológica sin aislamiento previo, purificación o concentración de la muestra biológica. Por ejemplo, una muestra de sangre puede ponerse en contacto con un aptámero modificado con clic para capturar y/o detectar (por ejemplo, marcar) microvesículas en la muestra. Por ejemplo, la cantidad de microvesículas en la muestra puede proporcionar por sí misma un perfil de biomarcador que proporciona una determinación diagnóstica, pronóstica o tratanóstica. Alternativamente, la microvesícula en la muestra puede aislarse, capturarse, purificarse o concentrarse a partir de una muestra antes del análisis. Como se ha indicado, aislamiento, captura o purificación como se usan en el presente documento comprenden aislamiento parcial, captura parcial o purificación parcial separado de otros componentes en la muestra. El aislamiento de microvesículas puede realizarse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, cromatografía, filtración, centrifugación, citometría de flujo, captura por afinidad (por ejemplo, a una superficie plana o perla) y/o utilizando microfluídica. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente Internacional WO/2010/056337, WO 2011/109440, WO 2011/127219, WO 2012/024543, WO 2009/015357, WO 2011/088226, WO 2012/0115885, WO 2012/174282, WO 2013/022995, WO 2012/170711 para detalles adicionales sobre la evaluación de microvesículas.

Las microvesículas pueden evaluarse para proporcionar una caracterización fenotípica comparando las características de las microvesículas con una referencia. En algunas realizaciones, se evalúan los antígenos de superficie en una microvesícula. Los antígenos de superficie pueden proporcionar una indicación del origen anatómico y/o celular de las microvesículas y otra información fenotípica, por ejemplo, estado del tumor. Se

encuentran microvesículas en una muestra de paciente, por ejemplo, un fluido corporal tales como sangre, suero o plasma, puede evaluarse para antígenos de superficie indicativos de origen y la presencia de un cáncer. Los antígenos de superficie pueden comprender cualquier entidad biológica informativa que pueda detectarse en la superficie de membrana de la microvesícula, incluyendo sin limitación proteínas de superficie, lípidos, carbohidratos y otros componentes de membrana. Como ejemplo no limitante, la detección positiva de microvesículas derivadas de colon que expresan antígenos tumorales puede indicar que el paciente tiene cáncer colorrectal. Como tales, los métodos de la presente divulgación pueden usarse para caracterizar cualquier enfermedad o afección asociada a un origen anatómico o celular, evaluando, por ejemplo, biomarcadores específicos de la enfermedad y específicos de la célula de una o más microvesículas obtenidas de un sujeto. Los aptámeros modificados por clic pueden usarse para capturar y/o detectar (por ejemplo, marcar) microvesículas según se desee.

Los métodos pueden comprender evaluar una o más cargas útiles de microvesículas para proporcionar una caracterización fenotípica. La carga útil dentro de una microvesícula comprende cualquier entidad biológica informativa que pueda detectarse como encapsulada dentro de la microvesícula, incluyendo sin limitación proteínas y ácidos nucleicos, por ejemplo, genómico o ADNc, ARNm, o fragmentos funcionales de los mismos, así como microARN (miR). Además, los métodos de la presente descripción están dirigidos a detectar antígenos de superficie de microvesículas (además o exclusivamente de la carga útil de microvesículas) para proporcionar una caracterización fenotípica. Por ejemplo, las microvesículas pueden caracterizarse mediante el uso de agentes aglutinantes (por ejemplo, aptámeros modificados por clic) que son específicos de los antígenos de superficie de las microvesículas, y las microvesículas unidas pueden evaluarse adicionalmente para identificar uno o más componentes de carga útil desvelados en ellos. También puede usarse un aptámero modificado con clic para evaluar la carga útil, por ejemplo, en formato de inmunoensayo. Como se describe en el presente documento, los niveles de microvesículas con antígenos de superficie de interés o con carga útil de interés pueden compararse con una referencia para caracterizar un fenotipo. Por ejemplo, la sobreexpresión en una muestra de antígenos de superficie relacionados con el cáncer o carga útil de microvesículas, por ejemplo, un tumor asociado a ARNm o microARN, en comparación con una referencia, puede indicar la presencia de cáncer en la muestra. Los biomarcadores evaluados pueden estar presentes o ausentes, aumentados o reducidos en función de la selección de la muestra diana deseada y la comparación de la muestra diana con la muestra de referencia deseada. Los ejemplos no limitantes de muestras diana incluyen: enfermedad; tratado/no tratado; puntos de tiempo diferentes, tales como en un estudio longitudinal; y ejemplos no limitantes de muestra de referencia: no enfermedad; normal; puntos de tiempo diferentes; y sensible o resistente a tratamiento o tratamientos candidatos.

### Productos terapéuticos

Como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una composición que alivia (en cierta medida, según lo juzgado por un médico experto) uno o más síntomas de la enfermedad o afección en un mamífero. Adicionalmente, por "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición se entiende una cantidad que vuelve a la normalidad, bien parcial o completamente, parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados a o causales de una enfermedad o afección. Un médico experto en la materia puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz de una composición para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno particular cuando se administra, tales como por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía oral o a través de inhalación. La cantidad precisa de la composición requerida para ser terapéuticamente eficaz dependerá de numerosos factores, por ejemplo, tales como la actividad específica del principio activo, el dispositivo de entrega empleado, características físicas del agente, fin para la administración, además de muchas consideraciones específicas del paciente. Pero la determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la habilidad de un médico con experiencia ordinaria al apreciar la divulgación establecida en el presente documento.

Los términos "tratar", "tratamiento", "terapia" y "tratamiento terapéutico" como se usa en el presente documento se refiere a terapia curativa, terapia profiláctica o terapia preventiva. Un ejemplo de "terapia preventiva" es la prevención o la disminución de la posibilidad de una enfermedad marcada como diana (por ejemplo, cáncer u otra enfermedad proliferativa) o afección relacionada con la misma. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la enfermedad o afección, así como aquellos propensos a tener la enfermedad o afección a prevenir. Los términos "tratar", "tratamiento", "terapia" y "tratamiento terapéutico" como se usa en el presente documento también describen la gestión y el cuidado de un mamífero con el fin de combatir una enfermedad o afección relacionada, e incluye la administración de una composición para aliviar los síntomas, efectos secundarios u otras complicaciones de la enfermedad, afección. El tratamiento terapéutico para el cáncer incluye, pero no se limita a, cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia génica e inmunoterapia.

Como se usa en el presente documento, el término "agente" o "fármaco" o "agente terapéutico" se refiere a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto fabricado a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos, o células o tejidos animales (particularmente mamíferos) que se sospecha que tienen propiedades terapéuticas. El agente o fármaco puede estar purificado, sustancialmente purificado o parcialmente purificado. Un "agente" también incluye un agente de radioterapia o un "agente quimioterapéutico".

Como se usa en el presente documento, la frase "agente de diagnóstico" se refiere a cualquier sustancia química usada en la obtención de imágenes de tejido enfermo, tales como, por ejemplo, un tumor.

5 Como se usa en el presente documento, la frase "agente quimioterapéutico" se refiere a un agente con actividad contra el cáncer, enfermedades neoplásicas y/o proliferativas o que tienen la capacidad de matar células cancerosas directamente.

10 Como se usa en el presente documento, las "formulaciones farmacéuticas" incluyen formulaciones para uso humano y veterinario sin efecto toxicológico adverso significativo. "Formulación farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento se refiere a una composición o formulación que permite la distribución efectiva de las moléculas de ácido nucleico en la ubicación física más adecuada para su actividad deseada.

15 Como se usa en el presente documento la frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones.

20 Los aptámeros modificados por clic pueden usarse directamente para aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, para bloquear la unión de la diana de interés. Los aptámeros modificados por clic pueden conjugarse con toxinas u otras moléculas efectoras. Un extenso trabajo previo ha desarrollado el concepto de conjugados de anticuerpo-toxina ("inmunoconjugados") como posibles terapias para un intervalo de indicaciones, por ejemplo, dirigidos al tratamiento del cáncer. Se ha probado una gran diversidad de diferentes agentes terapéuticos para administración dirigida a  
25 diana en estudios preclínicos y clínicos, incluyendo toxinas proteicas, citotóxicos de molécula pequeña de alta potencia, radioisótopos y fármacos encapsulados en liposomas. Aunque estos esfuerzos han producido con éxito terapias aprobadas por la FDA para tumores hematológicos, los inmunoconjugados como una clase (especialmente para tumores sólidos) han arrojado históricamente resultados decepcionantes atribuibles a múltiples propiedades diferentes de los anticuerpos, incluyendo tendencias para desarrollar respuestas de anticuerpos neutralizantes a  
30 anticuerpos no humanizados, penetración limitada en tumores sólidos, pérdida de la afinidad de unión a diana como resultado de la conjugación de toxinas y desequilibrios entre la vida media del anticuerpo y la vida media del conjugado de toxina que limitan el índice terapéutico general (revisado por Reff y Heard, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 40 (2001):25-35).

35 Los aptámeros son funcionalmente similares a los anticuerpos, excepto su absorción, distribución, las propiedades de metabolismo y excreción ("ADME") son intrínsecamente diferentes y generalmente carecen de muchas de las funciones efectoras inmunes generalmente asociadas a los anticuerpos (por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, citotoxicidad dependiente del complemento). Al comparar muchas de las propiedades de los aptámeros y anticuerpos descritos anteriormente, varios factores sugieren que el suministro de toxinas a  
40 través de aptámeros ofrece varias ventajas concretas sobre el suministro con anticuerpos, en última instancia, les ofrece un mejor potencial como terapéutica. Varios ejemplos de las ventajas de la administración de toxinas a través de aptámeros sobre los anticuerpos son los siguientes:

45 1) Los conjugados de aptámero-toxina se sintetizan químicamente por completo. La síntesis química proporciona más control sobre la naturaleza del conjugado. Por ejemplo, la estequiometría (proporción de toxinas por aptámero) y el sitio de unión pueden definirse con precisión. Pueden probarse fácilmente diferentes químicas de enlazador. La reversibilidad del plegamiento de aptámero significa que la pérdida de actividad durante la conjugación es poco probable y proporciona más flexibilidad para ajustar las condiciones de conjugación para maximizar los rendimientos.

50 2) Un tamaño más pequeño permite una mejor penetración tumoral. La mala penetración de anticuerpos en tumores sólidos a menudo se cita como un factor que limita la efectividad de los enfoques conjugados. Véase Colcher, D., Goel, A., Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B., Batra, S. K. (1999) "Effects of genetic engineering on the pharmacokinetics of antibodies", *Q. J. Nucl. Med.*, 43: 132-139. Los estudios que comparan las propiedades de los aptámeros anti-tenascina C no PEGilados con los anticuerpos correspondientes demuestran una captación eficaz en los tumores (según lo definido por la relación tumor:sangre) y evidencian que el aptámero localizado en el tumor tiene una vida inesperadamente larga ( $t_{1/2} > 12$  horas) (Hicke, B. J., Stephens, A. W., "Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy", *J. Clin. Invest.*, 106:923-928 (2000)).

60 3) PK sintonizable. La vida media/metabolismo del aptámero puede ajustarse fácilmente para que coincida con las propiedades de la carga útil, optimizando la capacidad de administrar toxinas al tumor mientras se minimiza la exposición sistémica. Las modificaciones apropiadas al esqueleto del aptámero y la adición de PEG de alto peso molecular deberían permitir hacer coincidir la vida media del aptámero con la vida media intrínseca de la toxina/enlazador conjugado, minimizando la exposición sistémica a metabolitos no funcionales que contienen  
65 toxinas (esperado si  $t_{1/2}(\text{aptámero}) < t_{1/2}(\text{toxina})$ ) y reduciendo la probabilidad de que el aptámero no conjugado persistente bloquee funcionalmente la absorción del aptámero conjugado (esperado si  $t_{1/2}(\text{aptámero}) \gg t_{1/2}$

(toxina)).

4) Requisitos de material relativamente bajos. Es probable que los niveles de dosificación estén limitados por la toxicidad intrínseca a la carga útil citotóxica. Como tales, un curso único de tratamiento probablemente implicará cantidades relativamente pequeñas (<100 mg) de aptámero, reduciendo la probabilidad de que el coste de la síntesis de oligonucleótidos sea una barrera para las terapias basadas en aptámeros.

5) Se prefiere la administración parenteral para esta indicación. No habrá necesidad especial de desarrollar formulaciones alternativas para impulsar la aceptación del paciente/médico.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero modificado con un clic proporcionado por la invención o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del aptámero o una sal del mismo, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. De forma relacionada, La presente divulgación proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad o trastorno, que comprende administrar la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesita. Administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición al sujeto puede dar como resultado: (a) una mejora de la administración del principio activo a un sitio de la enfermedad en relación con la administración del principio activo solo; o (b) una mejora de la eliminación de la diana dando como resultado una disminución de al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % en un nivel de la diana del aptámero, por ejemplo, una proteína o microvesícula circulante; o (c) una disminución en la actividad biológica de la diana del aptámero, por ejemplo, una proteína o microvesícula circulante, de al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 %. En una realización, La actividad biológica de las microvesículas comprende la supresión inmune o la transferencia de información genética. La enfermedad o trastorno puede incluir, sin limitación, aquellos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, la enfermedad o trastorno puede comprender una enfermedad o trastorno neoplásicos, proliferativos o inflamatorios, metabólicos, cardiovasculares o neurológicos. Véase, por ejemplo, la sección "Fenotipos" en el presente documento.

### Ejemplos

#### Material

#### Ácidos nucleicos:

nombre	especificación	proveedor
Biblioteca (Cy5-FT2-N42-EdU): Cy5-CAC GAC GCA AGG GAC CAC AGG NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN CAG CAC GAC ACC GCA GAG GCA; (SEQ ID NO: 1)		Ella Biotech, Alemania
N: dA, dC, dG, Etil-dU (1:1:1:1) CAC GAC GCA AGG GAC CAC AGG (SEQ ID NO: 2)	cebador directo (FT2- F)	Ella Biotech, Alemania
Cy5-CAC GAC GCA AGG GAC CAC AGG (SEQ ID NO: 2)	cebador directo (FT2-F-Cy5)	Microsynth AG, Suiza
Fosfato-TGC CTC TGC GGT GTC GTG CTG (SEQ ID NO: 3)	cebador inverso (FT2-RP)	Microsynth AG, Suiza

#### Proteínas:

nombre	especificación	proveedor	N.º de Catálogo
ADN polimerasa <i>Pwo</i>	2,5 U/μl	Genaxxon, Alemania	M3002.0100
λ-Exonucleasa	10 U/μl	Thermo Scientific	EN0562
Seroalbúmina bovina (BSA)		Sigma-Aldrich	A9418-10G
Polinucleótido quinasa T4		New England Biolabs	M0201L
Proteína fluorescente verde (GFP)		Life Technologies	13105-S07E-250



Se calentaron 100 µl (aproximadamente 500 pmol) de la biblioteca de inicio de ADN purificada y con clic de la etapa 5.1 en 1X D-PBS a 95 °C durante 3 minutos y se dejaron enfriar lentamente a temperatura ambiente en lo sucesivo. Se añadieron 50 µl (500 µg) de perlas magnéticas desacopladas (en tampón SELEX) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, 800 rpm. El sobrenadante se añadió a 50 µl (500 µg) de GFP - suspensión de perlas y se incubó durante 30 minutos a 37 °C, 800 rpm. El sobrenadante se desechó y las perlas se lavaron 3 veces durante 30 segundos con 200 µl de tampón SELEX. Se añadieron 100 µl de solución de imidazol 300 mM y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C, 800 rpm. Este sobrenadante se usó para la posterior amplificación por PCR.

#### 2.4 - Amplificación de los ácidos nucleicos de unión

El ADN eluido (biblioteca enriquecida) se dividió en 8 alícuotas y se amplificó por PCR como sigue: Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 100 µl de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo y ciclado de la tabla 1 en un termociclador Mastercycler® Personal (Eppendorf). Las muestras se ciclaron hasta que se pudo detectar la banda de producto deseada en un gel de agarosa al 4 % teñido con bromuro de etidio.

Tabla 5:

Reactivo	Conc. madre	Conc. final
Agua		
Solución de ADN		
Tampón PWO	10X	1X
dN*TP	25 mM	250 µM
Cebador F	50 µM	0,5 µM
Cebador R	50 µM	0,5 µM
PWO-Pol.	2,5 U/µl	2,5 U
dN*TP: dATP/dCTP/dGTP/Etiniil-dUTP		

El esquema de ciclado fue como sigue: 2 min a 95 °C, seguido de 30 segundos a 95 °C/30 segundos a 62 °C/1 min a 72 °C durante X ciclos, almacenamiento a 4 °C.

Los productos de PCR ADNbc se purificaron con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y como respaldo de esta ronda SELEX 10 % del ADNbc purificado se almacenaron a -20 °C.

#### 2.5 - Desplazamiento monocatenario

El producto de PCR ADNbc purificado se suplementó con 40 µl de tampón de reacción de exonucleasa 10 X y se añadieron 8 µl de exonucleasa lambda. La mezcla se incubó durante 60 minutos a 37 °C, 800 rpm y el producto de digestión ADNmc se purificó con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR de acuerdo con la recomendación del fabricante

#### 2.6 - Funcionalización de la biblioteca enriquecida

Para la siguiente ronda SELEX, la biblioteca enriquecida monocatenaria se funcionalizó nuevamente con Indol-Azida en una reacción CuAAC de la siguiente manera: se mezclaron 150 µl de la solución de ADN con 20 µl de D-PBS y 20 µl de solución de azida 10 mM y se inició la reacción mediante la adición de 10 µl de solución de catalizador recién preparada (THPTA 10 mM, CuSO4 2 mM, ascorbato sódico 50 mM). La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a 37 °C, 800 rpm y el ssDNA funcionalizado se purificó con el gel NucleoSpin® y el kit de limpieza por PCR de acuerdo con la recomendación del fabricante.

#### 2.7 - Ronda SELEX 2ª a 15ª

Se añadieron 10 µl de D-PBS 10 X a 90 µl de la biblioteca de ADN con clic enriquecido (aproximadamente 50 pmol) y se realizó la siguiente ronda SELEX como se describe para la primera ronda. En total se realizaron 15 rondas de SELEX. Para aumentar la presión de selección, se redujo la cantidad de perlas funcionalizadas con GFP y se aumentaron los tiempos de lavado como se resume en la siguiente tabla 6:

Tabla 6:

Redonda	Perlas de GFP [µl]	Lavado 1	Lavado 2	Lavado 3
1	50	30 segundos	30 segundos	30 segundos
2	50	30 segundos	5 min	30 segundos
3	50	30 segundos	5 min	30 segundos
4	25	30 segundos	5 min	30 segundos
5	10	30 segundos	5 min	5 min
6-15	5	30 segundos	5 min	5 min

2.8 - Ensayo de unión de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS)

5 Se incubaron 45 µl de la solución de ADN de cadena sencilla marcada con Cy5 respectiva y 5 µl de la suspensión de perlas inmovilizadas con proteína respectiva durante 30 minutos a 37 °C, 800 rpm. El sobrenadante se desechó y las perlas se lavaron 1 vez durante 30 segundos y 1 vez durante 5 min con 200 µl de tampón SELEX. Las perlas se resuspendieron en 200 µl de D-PBS y se registraron 100000 eventos en un citómetro de flujo FACScantoll (BD Biosciences) que mide la fluorescencia Cy5 en el canal rojo.

10 La Figura 2 muestra los resultados de un ensayo de unión de FACS entre la biblioteca enriquecida de 15ª ronda y perlas magnéticas recubiertas de GFP. La biblioteca de 15ª ronda marcada con Cy5 da lugar a una intensidad de fluorescencia media dependiente de concentración mucho más alta en perlas de GFP en comparación con la biblioteca de partida. Este aumento en la afinidad de unión dependiente del clic demuestra el enriquecimiento exitoso de las secuencias de unión de GFP después de 15 rondas de SELEX de clic.

15 La Figura 3-A muestra "C12" una secuencia monoclonal aislada de la biblioteca enriquecida de 15ª ronda, que contiene seis nucleótidos de etinil-dU (EdU) clicables. La Figura 3-B muestra esquemáticamente la estructura química de un nucleótido de etinil-dU incorporado en una cadena de ADN.

20 La Figura 4 muestra los resultados de un ensayo de unión de FACS entre la secuencia monoclonal "C12" representada en la figura 7-A y las perlas magnéticas recubiertas de proteína. C12 da lugar a una intensidad de fluorescencia media dependiente de la concentración mucho más alta en las perlas de GFP en comparación con la biblioteca inicial. Sin embargo, en las perlas magnéticas recubiertas con ERK2 o estreptavidina, la situación se invierte y C12 muestra menos intensidad de fluorescencia media que la biblioteca de inicio. Esto muestra una alta especificidad de C12 por GFP en comparación con las dos proteínas de control.

**Ejemplo 3**

Detección de biomarcadores

30 Este Ejemplo ilustra el uso de los aptámeros modificados por clic identificados por el método de la presente invención para determinar un perfil de biomarcador en una muestra biológica.

3.1 - Captura de biomarcadores

35 Se identifica un aptámero modificado con clic usando los métodos de la invención que se une a la proteína diana de interés. El aptámero está unido directa o indirectamente a una superficie tales como una matriz plana, pocillo, microperla o matriz de columna. Puede usarse un conector para proporcionar un espacio deseado entre el aptámero y la superficie. Se pone en contacto la muestra biológica con la superficie y se permite al aptámero capturar cualquier diana que esté presente en la muestra.

3.2 - Detección de biomarcador

45 Se identifica un aptámero modificado con clic usando los métodos de la invención que se une a la proteína diana de interés. El aptámero está marcado, por ejemplo, con un marcador fluorescente, radiactivo, enzimático o metálico. El aptámero se pone en contacto con una muestra que comprende o se sospecha que comprende la diana del aptámero. El marcador se usa para detectar un complejo formado entre el aptámero y su diana.

3.3 - Formatos

50 Un experto apreciará que uno de los más aptámeros puede usarse en diversos ensayos en los que los anticuerpos se usan tradicionalmente. Dichos ensayos incluyen, sin limitación, inmunoensayos, ELISA, transferencia Western, ensayos sándwich, inmunoprecipitación, columna de afinidad, citometría de flujo, ensayos de microesferas y matrices proteómicas. Si está disponible y es deseable, los aptámeros pueden usarse tanto para la captura como para la detección en un único ensayo, por ejemplo, como ambos componentes en un formato de ensayo sándwich.

55 En otro formato a modo de ejemplo, uno o más aptámeros identificados por los métodos de la invención se ponen en contacto con la muestra, se recogen los aptámeros que unen la muestra y los aptámeros se secuencian para identificar los aptámeros que unen la muestra. La secuenciación puede realizarse usando la tecnología de secuenciación tradicional o de próxima generación.

**Ejemplo 4**

Diagnóstico de enfermedades

65 Este ejemplo ilustra el uso de los aptámeros modificados por clic identificados por el método de la presente

invención para diagnosticar una enfermedad proliferativa.

Una cantidad adecuada de un aptámero que se une a una microvesícula derivada de cáncer se sintetiza a través de medios químicos conocidos en la técnica. Los aptámeros se conjugan con un agente de diagnóstico adecuado para la detección, tales como un resto fluorescente, usando un método de conjugación conocido en la técnica.

La composición se aplica a microvesículas aisladas de muestras de sangre tomadas de una cohorte de prueba de pacientes que padecen una enfermedad proliferativa asociada a la sobreexpresión de microvesículas, por ejemplo, cáncer de próstata, de mama o de pulmón. La composición también se aplica a microvesículas aisladas de muestras de sangre tomadas de una cohorte de control negativo, que no padece una enfermedad proliferativa.

El uso de técnicas de detección apropiadas (por ejemplo, análisis de microperlas o citometría de flujo) en las muestras de la cohorte de prueba indica la presencia de enfermedad, mientras que las mismas técnicas aplicadas a las muestras de cohorte de control indican la ausencia de enfermedad.

Los resultados muestran que los aptámeros son útiles para diagnosticar enfermedades proliferativas.

### Ejemplo 5

Selección de tratamiento y monitorización para el cáncer de próstata

Este Ejemplo usa un aptámero para detectar un perfil de biomarcadores para el cáncer de próstata. El aptámero modificado con clic se identifica seleccionando aptámeros que se unen a las microvesículas derivadas del cáncer de próstata. Las microvesículas se detectan en una muestra de sangre de un paciente usando un aptámero para capturar las microvesículas. La cantidad de microvesículas detectadas se compara con un valor de referencia indicativo de un estado saludable para proporcionar el perfil de biomarcador.

El perfil de biomarcador se usa para monitorizar una efectividad de un tratamiento para el cáncer de próstata. Se identifica a un paciente con un nivel de PSA en suero sospechoso (por ejemplo, PSA en suero > 4,0 ng/ml) y/o un examen rectal digital sospechoso (DRE). El perfil de biomarcadores se determina para el paciente y los resultados son positivos para el cáncer de próstata. El médico tratante determina si tratar el cáncer de próstata con un agente terapéutico, terapia hormonal y/o cirugía (prostatectomía). Después del tratamiento, el perfil del biomarcador se determina nuevamente para el paciente. Un resultado positivo indica una respuesta negativa del paciente al tratamiento y que se requiere tratamiento adicional. Un resultado negativo indica una respuesta positiva del paciente al tratamiento y que puede no ser necesario un tratamiento adicional.

### Ejemplo 6

Aptámeros terapéuticos

Este Ejemplo ilustra el uso de un aptámero modificado con clic identificado usando los métodos de la invención para tratar una enfermedad proliferativa en un ratón.

Una cantidad adecuada de un aptámero que se une a una microvesícula derivada de cáncer se sintetiza a través de medios químicos conocidos en la técnica. Los aptámeros se conjugan con un agente quimioterapéutico usando un método de conjugación conocido en la técnica. El conjugado se formula en una composición acuosa.

La composición se administra por vía intravenosa, en una o más dosis, a una cohorte de prueba de ratones que padecen una enfermedad proliferativa asociada a la sobreexpresión de las microvesículas, por ejemplo, modelo de cáncer de próstata, de mama o de pulmón. A una cohorte control, que no padece una enfermedad proliferativa, se administra la composición idéntica por vía intravenosa, según un régimen de dosificación correspondiente.

El análisis patológico de las muestras tumorales y/o la supervivencia del ratón indican que la mortalidad y/o la morbilidad mejoran en la cohorte de prueba sobre la cohorte control.

Los resultados muestran que los aptámeros son útiles en el tratamiento de enfermedades proliferativas.

Los aptámeros que se determina que son útiles en el modelo de ratón se analizan para el tratamiento del cáncer en otros organismos, por ejemplo, un ser humano.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Mayer, Gunter Tolle, Fabian

<120> Un método para identificar o producir un aptámero



<130> UD 40748  
 <150> US 62/058703  
 <151> 02/10/2014  
 5 <160> 3  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 10 <210> 1  
 <211> 84  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> biblioteca  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (22)..(63)  
 <223> n es a, c, g o u  
 <400> 1  
 cacgacgcaa gggaccacag gnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60  
 nnnccagcacg acaccgcaga ggca 84  
 25 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador directo  
 <400> 2  
 cacgacgcaa gggaccacag g 21  
 35 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> cebador inverso  
 <400> 3  
 45 tgctctgcg gtgtcgtgct g 21

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar o para producir un aptámero en un proceso de selección *in vitro*, que comprende las etapas de:
- 5 (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, en donde la mezcla comprende al menos un nucleótido, que se modifica para comprender una funcionalización introducida por química de clic, en donde el nucleótido modificado comprende una nucleobase modificada con alquino, que se modifica adicionalmente a través de una cicloadición 1,3 dipolar de una azida, para producir una nucleobase modificada con azida-alquino, en donde la
- 10 nucleobase que se ha modificado para contener el grupo azida-alquino era un nucleótido etinil-dU, dA, dC o dG;
- (b) poner en contacto la mezcla candidata con una muestra diana;
- (c) separar los ácidos nucleicos, que se unen a la muestra diana de aquellos que no se unen;
- (d) amplificar los ácidos nucleicos de unión para producir una población de ácidos nucleicos, que se unen a la
- 15 muestra diana, identificando o produciendo de esta manera un aptámero,
- en donde los ácidos nucleicos de unión se amplifican por PCR, usando una nucleobase modificada con etinilo y nuevamente se someten a un ciclo de selección *in vitro* hasta que se detecte un enriquecimiento de ácidos nucleicos que se unen a la diana.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además desplazar una cadena de al menos un ácido nucleico amplificado en la etapa (d) y la modificación adicional del ácido nucleico para introducir otra funcionalización.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la nucleobase modificada con azida-alquino comprende restos alifáticos, aromáticos, cargados, básicos, ácidos, heteroaromáticos, de tipo azúcar, que contienen metales o
- 25 peptídicos.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de amplificación (d) emplea una reacción en cadena de la polimerasa, usando una nucleobase modificada con alquino, que se modifica adicionalmente a través de una cicloadición 1,3 dipolar de una azida, para producir una nucleobase modificada con azida-alquino.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en el que la azida comprende una molécula sensible a la luz.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra diana se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido, un péptido, una célula, un fragmento celular, una membrana celular, una molécula orgánica pequeña, un cultivo celular, una muestra de tejido, una microvesícula, una muestra de fluido biológico y una combinación de los
- 35 mismos.

Figura 1

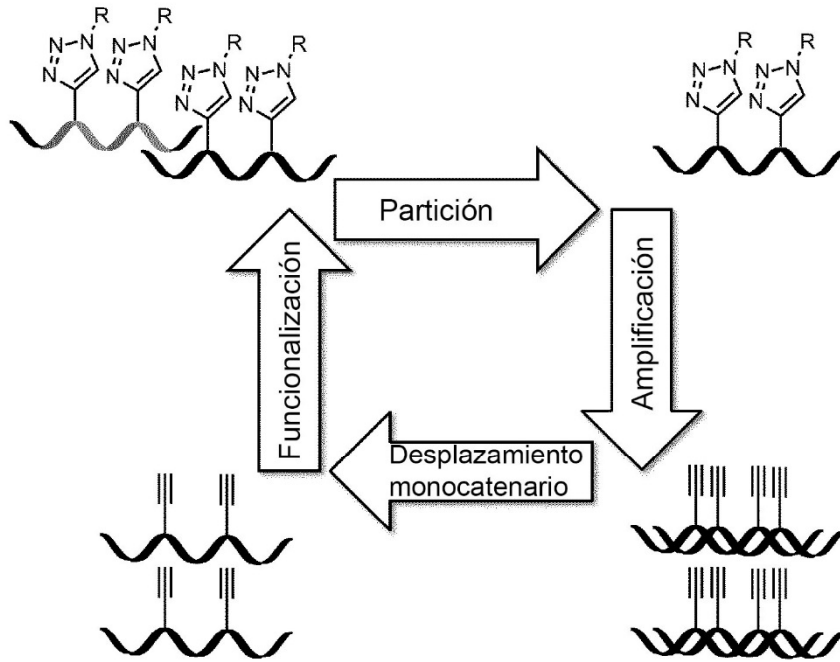


Figura 2

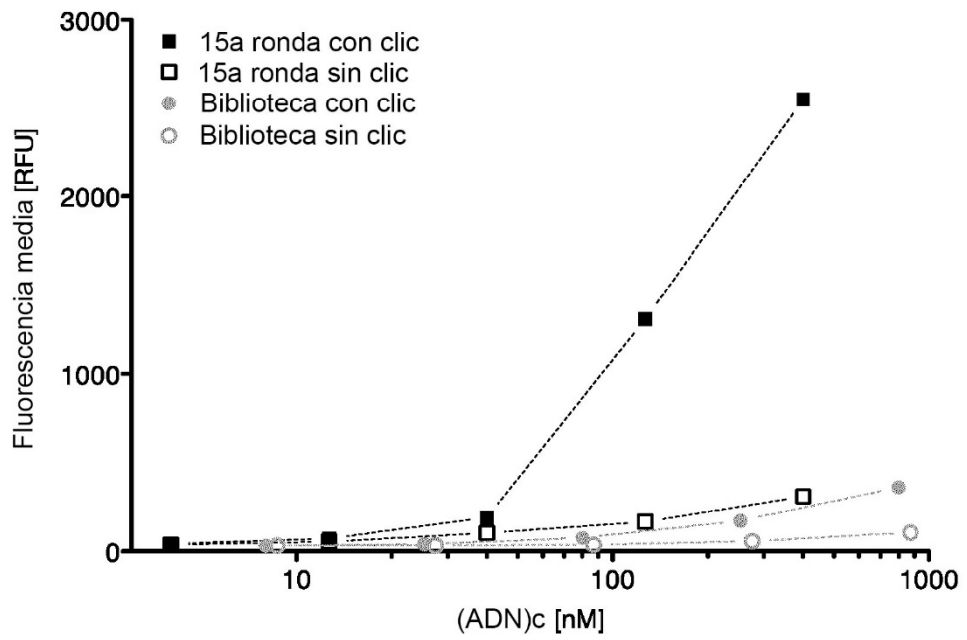


Figura 3

**A**

CAAGACGCAAGGGACCACAGG  
 GXXGGAAGCGACGGGACGGXAAGGCXXGGGCCCAAGGAGXG  
 CAGCACGACACCCGAGAGGCA

X: Etilil-dU

**B**

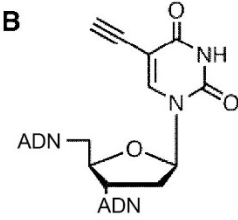


Figura 4

