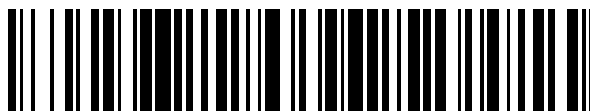


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 504**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2016** **PCT/AU2016/050085**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016** **WO16127216**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2016** **E 16748486 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3256593**

54 Título: **Aptámeros de EpCAM y conjugados de los mismos**

30 Prioridad:

11.02.2015 AU 2015900437

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SHIGDAR, SARAH

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 796 504 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aptámeros de EpCAM y conjugados de los mismos

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a aptámeros de EpCAM y conjugados de aptámeros de EpCAM que tienen actividad bifuncional y a usos de los mismos. Los aptámeros y conjugados de aptámeros son útiles para el tratamiento de tumores cerebrales y/o metástasis cerebral.

10

Antecedentes de la invención

En el mundo desarrollado, el cáncer es actualmente la principal causa de muerte, debido principalmente al envejecimiento de la población. Las tasas de supervivencia se reducen para aquellos pacientes cuyo cáncer sufre metástasis en otro sitio del cuerpo y las metástasis cerebrales tienen particularmente un mal pronóstico, con una supervivencia promedio de menos de seis meses. Se estima que las metástasis cerebrales caracterizan el 8,5-9,6 % de todos los diagnósticos de cáncer y son diez veces más frecuentes que los tumores cerebrales primarios, con la mayoría de estos tumores secundarios procedentes de cáncer de pulmón primario, de mama, de piel (melanoma) y cáncer colorrectal, y melanoma maligno.

20

Como la mayoría de los cánceres, el tratamiento de la metástasis cerebral implica tres opciones; la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia. Si bien estas estrategias pueden prolongar la supervivencia de los pacientes y mejorar la calidad de vida, el pronóstico para los pacientes sigue siendo desalentador. La resección quirúrgica tiene altas tasas de recurrencia, y tanto la quimioterapia como la radioterapia son no específicas y tienen perfiles de seguridad pobres.

25

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos se complican aún más por el acceso limitado de circulación de fármacos al parénquima cerebral. La temozolomida (TMZ) es un fármaco que puede entrar en el cerebro, sin embargo, todavía está limitado por falta de eficacia (Minniti G y col., (2014) J Neurooncol 118(2):329-34). Como tal, existe una necesidad de fármacos dirigidos que pueden entrar en primer lugar en el entorno cerebral, pero también limitan su toxicidad para las células cancerosas, y en particular la subpoblación tumorigénica.

30

El tratamiento de los tumores cerebrales se complica por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), que aísla el microentorno cerebral de la circulación sistémica mediante la regulación estricta del paso de moléculas. Como tal, los fármacos quimioterapéuticos son apenas capaces de entrar en el cerebro, a pesar de que todavía pueden dañar cualquier parte del cuerpo.

35

Los tumores cerebrales tan pequeños como 1 mm pueden comprometer la permeabilidad de la BHE. Sin embargo, este efecto no es homogéneo en toda la BHE, y como tal, hace poco para mejorar la administración de cantidades suficientes de fármacos (Huse JT y col., (2010) Nature Reviews Cancer 10(5):319-31). Una técnica empleada para evitar el problema presentado por la BHE, la inyección craneal directa, es bastante invasiva y nociva (Lassaletta A y col., (2009) 95(1):65-9). Si bien esta estrategia ha demostrado ser efectiva, conlleva el riesgo de infección y otros efectos secundarios. Otros procedimientos implican el aumento de la permeabilidad de la BHE por medios osmóticos o químicos. De nuevo, estas son las opciones de tratamiento de riesgo, y tienen el potencial de inducir convulsiones y otros efectos secundarios neurológicos.

40

El receptor 1 de transferrina (TfR) es una glicoproteína de membrana que participa en la homeostasis del hierro. Se expresa fuertemente en la superficie de la BHE, así como en muchas estirpes celulares de cáncer (Wilner SE y col., Mol Ther Nucleic Acids 2012;1:e21) y se ha identificado como una diana efectiva para la transcitos mediada por receptores (TMR) de conjugados farmacológicos a través de la BHE. Mientras que el TfR se satura en la mayoría de tipos celulares donde se expresa, tal como glóbulos rojos, hepatocitos, células intestinales, macrófagos y el propio cerebro, no se satura en la BHE, donde su expresión es considerablemente mayor. El documento WO 2013/163303 describe una unión del aptámero al receptor de transferrina.

50

Se ha propuesto que el crecimiento de los cánceres es estimulado por la presencia de una subpoblación única de células con propiedades autorrenovantes. Estas células madre cancerosas (CMC) son relativamente quiescentes y resistentes a los fármacos, y hay evidencia que sugiere que pueden surgir a partir de células madre normales o de modificaciones epigenéticas resultantes de la desdiferenciación de otras células. Por otra parte, parece que la interconversión es posible entre CMC y células progenitoras, que algunos han sugerido que puede caracterizarse como un equilibrio dinámico.

55

La primera línea de evidencia que apunta a la existencia de CMC eran estudios con el xenotrasplante de diluciones en serie de células cancerosas en ratones inmunodeficientes. Estos han descubierto que se necesita un gran número de células para desarrollar cáncer en el modelo animal, lo que sugiere que solo algunas células tienen la capacidad

60

para hacerlo.

Dado el papel que las CMC desempeñan en el desarrollo de tumores, existe una necesidad de nuevos agentes terapéuticos dirigidos que puedan ser dirigidos hacia la eliminación específica de esta población de células (que pueden ser refractarias al tratamiento con terapia convencional) además del tumor, y que sean además capaces de atravesar la BHE para tratar tumores cerebrales y metástasis cerebrales, incluyendo tumores cerebrales inoperables.

Resumen

Por consiguiente, la presente invención proporciona un conjugado de aptámeros bifuncionales, así como agentes anticancerígenos, agentes de diagnóstico, composiciones y agentes de administración que comprenden el conjugado de aptámero bifuncional, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La eficacia de los anticuerpos en el tratamiento de los tumores cerebrales se ve obstaculizada por su tamaño comprometiendo así su capacidad de pasar la barrera hematoencefálica (BHE). Debido a que los aptámeros son significativamente más pequeños en tamaño en comparación con los anticuerpos, y carecen de efectos mediados por Fc no específicos que pueden comprometer la terapia de anticuerpos, son particularmente ventajosos sobre los anticuerpos para la terapia contra el cáncer. La presente descripción se dirige a aptámeros bifuncionales que pueden dirigirse de manera efectiva a metástasis cerebrales y/o a tumores cerebrales.

La presente descripción describe un aptámero de EpCAM que se une a EpCAM, así como un conjugado de aptámeros de EpCAM que presenta una funcionalidad doble de ser capaz de pasar a través de la barrera hematoencefálica y que se une a un marcador presente en las células tumorales localizadas en el cerebro. El aptámero o conjugado de aptámeros puede ser cargado con un agente quimioterapéutico que se administra al tumor, dando como resultado la muerte de las células tumorales. El conjugado de aptámeros es capaz de entrar en el cerebro a través de la transcitosis mediada por receptores (TMR) y la unión a un marcador de células madre cancerosas expresado por un tumor cerebral o metástasis cerebral. En un ejemplo particular, el conjugado de aptámeros se une a EpCAM y al receptor de transferrina (TfR). El conjugado de aptámeros puede ser ARN o ADN o una combinación de ARN y ADN. En un ejemplo, el conjugado de aptámeros se une a EpCAM humana. En un ejemplo adicional, el conjugado de aptámeros se une a TfR humano. En un ejemplo adicional, el conjugado de aptámeros se une específicamente a EpCAM y se une específicamente al receptor de transferrina (TfR). En otro ejemplo, el conjugado de aptámeros se une a TfR independientemente de su unión a EpCAM y viceversa.

En un ejemplo, el conjugado de aptámeros es una fusión de dos secuencias de aptámero (o "porciones de unión" como se describe en esta invención). En otro ejemplo, el conjugado de aptámeros contiene una secuencia de aptámero (o porción de unión) vinculada a otra secuencia de aptámero (o porción de unión). Las secuencias enlazadoras adecuadas serán conocidas en la técnica.

El aptámero o conjugado de aptámeros de la presente descripción puede ser generado sintéticamente. En otro ejemplo, el aptámero o conjugado de aptámeros está aislado o purificado.

En una realización, la presente descripción proporciona un aptámero que se une a EpCAM que comprende una secuencia de la región de bucle seleccionada de entre cualquiera de (i) bases 5 a 13 de SEQ ID NO: 9 AGGTTGCGT), (ii) bases 4 a 13 de SEQ ID NO: 11 (ACGTTGTCAT) o (iii) bases 4 a 9 de SEQ ID NO: 12 (GTTGGC) y opcionalmente una o más sustituciones en las mismas.

El aptámero puede comprender una, dos o tres sustituciones dentro de la secuencia de región de bucle como se ha especificado anteriormente.

En un ejemplo, el aptámero comprende una región de bucle de bases 5 a 13 de SEQ ID NO: 9 y una región de tallo que comprende entre 3 y 15 bases de pares. En un ejemplo adicional, el aptámero comprende una región de tallo que comprende entre 4 y 10 bases de pares. En un ejemplo adicional, el aptámero comprende una región de tallo que comprende 10 bases de pares. En un ejemplo adicional, el aptámero comprende una región de tallo que comprende 4 bases de pares.

En un ejemplo, el aptámero comprende o consiste en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9. En un ejemplo, el aptámero comprende o consiste en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13.

En un ejemplo, el aptámero comprende una región de bucle de bases 4 a 13 de SEQ ID NO: 11 y una región de tallo que comprende entre 3 y 15 bases de pares. En un ejemplo, el aptámero comprende entre 3 y 5 bases de pares. En otro ejemplo, el aptámero comprende 3 bases de pares.

En un ejemplo, el aptámero comprende o consiste en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 11.

En un ejemplo, el aptámero comprende una región de bucle de bases 4 a 9 de SEQ ID NO: 12 y una región de tallo que comprende entre 3 y 15 bases de pares. En un ejemplo, el aptámero comprende entre 3 y 5 bases de pares. En un ejemplo, el aptámero comprende una región de tallo de 3 bases de pares.

En un ejemplo, el aptámero comprende o consiste en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12.

En un ejemplo, el aptámero tiene una afinidad de unión (K_D) para EpCAM de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 500 nM, de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 400 nM, de aproximadamente 3 nM a aproximadamente 300 nM, de aproximadamente 3 nM a aproximadamente 150 nM, de aproximadamente 3 nM a aproximadamente 100 nM, de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 nM, de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 80 nM, de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 50 nM, de aproximadamente 8 nM a aproximadamente 35 nM, de aproximadamente 8 nM a aproximadamente 10 nM, menos de 10 nM, o menos de 5 nM.

En otra realización, la presente descripción proporciona un conjugado de aptámeros que se une al receptor de transferrina (TfR) y a EpCAM. El conjugado de aptámeros puede ser ARN, ADN o una combinación de ARN y ADN. El conjugado de aptámeros puede unirse a TfR independientemente de su unión a EpCAM.

En un ejemplo, la presente descripción proporciona un conjugado de aptámeros que comprende una secuencia consenso 5' - GCG CGG X_1X_2 C CGC GCT AAC GGA GGT TGC GTC CGT - 3' (SEQ ID NO: 1) donde el conjugado de aptámeros se une a EpCAM y a TfR. En un ejemplo, X_1 y X_2 son A, T, C o G. En un ejemplo, X_1 es G o C y X_2 es A o T.

En un ejemplo, la presente descripción proporciona un conjugado de aptámeros que comprende la secuencia 5' -GCG CGG GCC CGC GCT AAC GGA GGT TGC GTC CGT- 3' (SEQ ID NO: 2) que tiene opcionalmente una o más sustituciones en la misma, donde el conjugado de aptámero se une a EpCAM y a TfR.

En un ejemplo, la presente descripción proporciona un conjugado de aptámeros que comprende la secuencia 5' -GCG CGG TAC CGC GCT AAC GGA GGT TGC GTC CGT- 3' (SEQ ID NO: 3) que tiene opcionalmente una o más sustituciones en la misma, donde el conjugado de aptámeros se une a EpCAM y a TfR.

La presente descripción también proporciona un conjugado de aptámeros que comprende la secuencia 5' - GC GCG GTA C CG CGC TA ACG G AT TCC TTT T CC GT- 3' (SEQ ID NO: 10) que tiene opcionalmente una o más sustituciones en la misma, donde el conjugado de aptámeros se une a EpCAM y a TfR.

En otro ejemplo, la secuencia según SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 10 comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce sustituciones en la misma. En otro ejemplo, la una o más sustituciones se producen en la porción de unión a TfR del conjugado de aptámeros. En otro ejemplo, la secuencia según SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 10 comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho sustituciones en la región de tallo del conjugado de aptámeros. En otro ejemplo, las al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho sustituciones se producen en la región de tallo de la porción de unión a TfR del conjugado de aptámeros. En un ejemplo, la región de tallo es aquella que predice dos estructuras dimensionales del conjugado de aptámeros.

En un ejemplo, la porción de unión a TfR no compite con transferrina para la unión al receptor de transferrina.

Los inventores descubrieron que las afinidades de unión de los aptámeros conjugados no se vio comprometida y las afinidades de unión eran normalmente similares, si no más fuertes en comparación con las de los aptámeros sencillos a partir de los cuales se derivaron.

En un ejemplo, el conjugado de aptámeros de la presente descripción tiene una afinidad de unión (K_D) para TfR de aproximadamente 300 a 340 nM. En otro ejemplo, el conjugado de aptámeros de la presente descripción tiene una afinidad de unión para TfR de entre 150 y 450 nM, entre 200 y 420 nM, entre 250 y 350 nM, entre 270 y 340 nM, o entre 300 y 340 nM. En un ejemplo, la afinidad de unión se mide en células bEnd.3.

En un ejemplo, el conjugado de aptámeros de la presente descripción tiene una afinidad de unión (K_D) para EpCAM de aproximadamente 210 a 220 nM. En otro ejemplo, el conjugado de aptámeros de la presente descripción tiene una afinidad de unión para EpCAM de entre 130 y 280 nM, entre 150 y 260 nM, entre 170 y 240 nM, o entre 200 y 220 nM. En un ejemplo, la afinidad de unión se mide en células HEY.

En un ejemplo, el conjugado de aptámero comprende una longitud de secuencia de entre 33 y 100 bases. En otro

ejemplo, el conjugado de aptámeros comprende una secuencia de entre 33 y 80 bases, entre 33 y 70 bases, entre 33 y 50 bases, o entre 33 y 40 bases.

En otro ejemplo, el conjugado de aptámeros comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 10 donde la longitud de la secuencia es de entre 33 y 100 bases. En otro ejemplo, la longitud de secuencia es de entre 33 y 80 bases, entre 33 y 70 bases, entre 33 y 50 bases, o entre 33 y 40 bases.

En otro ejemplo, el conjugado de aptámeros consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 10.

En otro ejemplo, el conjugado de aptámeros consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 10.

En otra realización, el aptámero o conjugado de aptámeros comprende una o más modificaciones (aptámero modificado) que mejoran la estabilidad del aptámero (*in vitro* o *in vivo*). Las modificaciones adecuadas se analizan en otra parte de esta invención. En un ejemplo, las bases de pirimidina son modificadas con 2'-flúor (2'-F). En otro ejemplo, el extremo 3' del conjugado de aptámeros se modifica para protegerlo de la digestión con nucleasas. En otro ejemplo, el conjugado de aptámeros se modifica mediante el acoplamiento del extremo 5' a un fluoróforo (por ejemplo, Cy3, Cy5 o TYE 665). En otro ejemplo, el aptámero o conjugado de aptámeros comprende un desoxitimidina invertida (dT), designada inv-dT (enlace inverso) en el extremo 3'.

En otro ejemplo, la presente descripción también proporciona un aptámero o conjugado de aptámeros que tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a EpCAM como la de un aptámero que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12. En un ejemplo, "que tiene sustancialmente la misma capacidad para unirse" significa que tiene sustancialmente la misma afinidad de unión o similar como el aptámero de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12. En otro ejemplo, "que tiene sustancialmente la misma capacidad para unirse" significa la unión al mismo epítipo o epítipo superpuesto como el aptámero de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

En un ejemplo, el aptámero o conjugado de aptámero se une específicamente a célula(s) EpCAM⁺.

En otro ejemplo, la(s) célula(s) EpCAM⁺ es(son) una célula(s) madre. En otro ejemplo, la célula madre es(son) una célula(s) madre cancerosa(s) aislada(s). En otro ejemplo, la(s) célula(s) madre cancerosa(s) se caracteriza(n) como (i) que expresan EpCAM, (ii) es(son) tumorigénica(s), (iii) es(son) capaz(ces) de autorrenovación, (iv) es(son) capaz(ces) de diferenciarse y (v) resistente(s) a la apoptosis por terapia convencional.

La(s) célula(s) madre cancerosa(s) se puede(n) describir alternativamente como aislada(s), enriquecida(s) o purificada(s) a partir de una fuente, tal como una muestra biológica. En otro ejemplo, la(s) célula(s) madre cancerosa(s) representa(n) una población de células enriquecidas sobre la base de la expresión EpCAM⁺. En otro ejemplo, la población de células comprende al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de células madre cancerosas.

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

En otro ejemplo, las células que expresan EpCAM y/o células madre cancerosas de la presente descripción pueden expresar uno o más antígenos adicionales, incluyendo CD44, ABCG2, β 3-catenina, CD133, ALDH, VLA-2, CD166, CD201, IGFR, y EGF1R.

En otro ejemplo, la célula madre cancerosa según la presente descripción es una metástasis de cáncer cerebral. En un ejemplo adicional, la metástasis se deriva de un cáncer primario de mama, de hígado o de colon.

En otro ejemplo, el conjugado de aptámero se une específicamente al receptor de transferrina (TfR). En otro ejemplo, el conjugado de aptámero es capaz de pasar a través de la barrera hematoencefálica. En otro ejemplo, el receptor de transferrina es el receptor 1 de transferrina.

En otra realización, la presente descripción también proporciona un agente de detección que comprende un aptámero o conjugado de aptámeros como se describe en esta invención acoplado a una etiqueta detectable.

En otra realización, la presente descripción también proporciona un agente de diagnóstico que comprende el aptámero o conjugado de aptámeros como se describe en esta invención acoplado a una etiqueta detectable.

5 Sería apreciado por los expertos en la materia que los conjugados de aptámero de la presente invención eviten complicaciones que puedan estar asociadas con la unión no específica a anticuerpos y, por ende, proporcionar una relación señal a ruido superior.

En un ejemplo, el agente de detección o de diagnóstico como se describe en esta invención se utiliza para detectar las células que expresan EpCAM *in vivo* o *in vitro*.

10 En un ejemplo, el aptámero o conjugado de aptámeros de la presente descripción se puede utilizar para detectar la presencia de células que expresan EpCAM y/o células madre cancerosas en un sujeto o en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene un tumor o se sospecha que tiene un tumor.

15 En un ejemplo adicional, el aptámero o conjugado de aptámeros se puede utilizar para diagnosticar la presencia de un tumor cerebral o metástasis cerebral en un sujeto o en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene un tumor o se sospecha que tiene un tumor.

En un ejemplo particular, la detección o el diagnóstico se basa en la detección de células que expresan EpCAM.

20 La detección puede facilitarse por acoplamiento del aptámero o conjugado de aptámeros a una etiqueta detectable. Los ejemplos de etiquetas detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, etiquetas densas en electrones, etiquetas para IRM y materiales radioactivos.

25 La presente descripción también proporciona un aptámero o conjugado de aptámeros como se describe en esta invención o el agente de detección como se describe en esta invención para su uso en el examen histológico de muestras biológicas. Los procedimientos para preparar preparaciones histológicas serán familiares para los expertos en la materia.

30 La presente descripción también proporciona un agente anticancerígeno que comprende un aptámero o conjugado de aptámeros como se describe en esta invención acoplado a un resto. En un ejemplo, el agente anticancerígeno, como se describe en esta invención se usa para tratar un tumor o cáncer cerebral, y/o metástasis cerebral en un sujeto. Los expertos en la materia de la presente descripción apreciarán que el agente anticancerígeno de la presente descripción
35 puede utilizarse para tratar cánceres o tumores que han surgido de *novo* en el cerebro o que se han desarrollado a partir de la metástasis de un tumor o cáncer primario que se origina fuera del cerebro. En un ejemplo, el sujeto es aquel que se beneficiaría del tratamiento con el aptámero o conjugado de aptámeros de la presente descripción. En otro ejemplo, el sujeto es uno que ha sido diagnosticado por tener cáncer cerebral o un tumor cerebral. Normalmente, un cáncer será reconocido como un crecimiento incontrolable que es maligno y, por lo tanto, capaz de generar
40 crecimientos secundarios. Un tumor puede ser maligno o benigno. Los tumores benignos se caracterizan por un crecimiento limitado en una determinada parte del cuerpo. En otro ejemplo, el sujeto es uno que tiene un tumor sólido. Con respecto a su utilidad en el tratamiento de tumores, los expertos en la materia apreciarán que el aptámero o conjugado de aptámeros de la presente descripción puede utilizarse para administrar un resto de tales tumores que disminuye el tamaño del tumor y/o su capacidad de crecer en el cerebro impidiendo o reduciendo así la capacidad de
45 los tumores a comprometer la función y/o integridad cerebral.

El aptámero o conjugado de aptámeros de la presente descripción se puede acoplar a un resto y el aptámero se utiliza para dirigir el resto al sitio de un tumor que comprende, o se sospecha que comprende células que expresan EpCAM (por ejemplo, células madre cancerosas que expresan EpCAM). Los ejemplos de restos incluyen toxinas, radionúclidos
50 o agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar para destruir las células que expresan EpCAM, o agentes de formación de imágenes que se pueden utilizar para localizar y medir tumores que comprenden células que expresan EpCAM. En un ejemplo adicional, el aptámero o conjugado de aptámeros se acopla con doxorubicina (dox). La doxorubicina se inserta preferentemente o se intercala en la(s) región(es) de tallo del aptámero o conjugado de aptámeros.

55 El agente anticancerígeno que comprende el aptámero o conjugado de aptámeros de la presente descripción puede incluir adicionalmente uno o más ingredientes efectivos. Los ingredientes efectivos pueden incluir uno o más agentes anticancerígenos adicionales.

60 La presente descripción también proporciona un procedimiento de aislamiento, purificación o enriquecimiento de una célula(s) que expresa(n) EpCAM y/o célula(s) madre cancerosa(s) de una muestra biológica obtenida de un sujeto, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula con un aptámero o conjugado de aptámeros de la

presente descripción o el agente de detección de la presente descripción. En un ejemplo, el procedimiento se lleva a cabo *in vitro*.

Los procedimientos de aislamiento, purificación o enriquecimiento de células que expresan EpCAM son conocidos por los expertos en la materia y también se describen en otra parte de esta invención.

La presente descripción también proporciona un procedimiento de identificación o detección de una célula(s) que expresa(n) EpCAM y/o célula(s) madre cancerosa(s) en un sujeto o en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene, o que se sospecha que tiene cáncer cerebral o un tumor cerebral y/o metástasis cerebral, que comprende el contacto de la célula o muestra con el aptámero o el conjugado de aptámeros de la presente descripción, o el agente de detección de la presente descripción.

La presente descripción también proporciona un procedimiento de diagnóstico de cáncer cerebral o de un tumor cerebral y/o metástasis cerebral, que comprende el contacto de la(s) célula(s) que expresa(n) EpCAM y/o la(s) célula(s) madre cancerosa(s) en un sujeto o en una muestra biológica obtenida de un sujeto con el conjugado de aptámeros de la presente descripción o el agente de diagnóstico de la presente descripción.

La presente descripción también proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de un cáncer o tumor cerebral y/o metástasis cerebral en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto un aptámero o conjugado de aptámeros como se describe en esta invención o el agente anticancerígeno como se describe en esta invención. En un ejemplo, el cáncer es cualquier cáncer en el que las células que expresan EpCAM y/o células madre cancerosas están presentes o se sospecha que están presentes. La metástasis cerebral puede ser aquella que tiene su origen en un cáncer primario situado en otra parte del cuerpo y que aparece en el cerebro meses o años después del tratamiento contra el cáncer primario.

Las células que expresan EpCAM se pueden encontrar en los tumores cerebrales, incluyendo, entre otros, astrocitoma, craneofaringioma, estesioblastoma, neurofibroma, tumor neuroectodérmico primitivo (TNEP). Adicionalmente, las células que expresan EpCAM se encuentran en varios tumores, incluyendo, entre otros, tumores de la piel (por ejemplo basalioma, melanoma, carcinoma de células Merkel), timoma, fibrosarcoma, tumores de las glándulas mamarias/de mama (por ejemplo, carcinoma apocrino, carcinoma cribiforme, carcinoma ductal, carcinoma medular apocrinas), tumores de endometrio, tumores de ovario (por ejemplo, carcinoma endometrial, carcinoma endometrioide, carcinoma seroso), carcinoma de próstata, tumor de riñón, tumor de vejiga, tumor de pulmón, tumores de colon y recto, (por ejemplo, adenoma de colon, adenocarcinoma de colon), tumor esofágico, tumores hepáticos, tumores pancreáticos, tumores de estómago, y tumores neuroendocrinos (por ejemplo, tumores carcinoides, adenoma de paratiroides, adenoma de tiroides, carcinoma folicular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides).

Se apreciará que los procedimientos de la presente descripción se puedan utilizar para administrar la terapia de cuerpo completo a un sujeto. Por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, el aptámero o conjugado de aptámeros se puede utilizar para dirigirse a tumores/cánceres o metástasis cerebrales, así como tumores localizados en otras partes del cuerpo que contiene células que expresan EpCAM. De esta manera, el aptámero o conjugado de aptámeros puede proporcionar una estrategia de terapia de cuerpo completo respecto al tratamiento.

En otro ejemplo, el sujeto es uno que ha sido diagnosticado por tener cáncer cerebral o un tumor cerebral y/o metástasis cerebral. En otro ejemplo, el sujeto es uno que tiene un tumor sólido.

En otro ejemplo, la presente descripción también se refiere al uso de un aptámero o conjugado de aptámeros o agente anticancerígeno como se describe en esta invención en medicina.

La presente descripción también se refiere al uso de un aptámero o conjugado de aptámeros o agente anticancerígeno como se describe en esta invención para tratar o evitar un cáncer cerebral, tumor cerebral y/o metástasis cerebral en un sujeto.

La presente descripción también se refiere a un aptámero o conjugado de aptámeros o agente anticancerígeno como se describe en esta invención para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer cerebral, tumor cerebral y/o metástasis cerebral en un sujeto.

La presente descripción también se refiere al uso de un aptámero o conjugado de aptámeros o agente anticancerígeno como se describe en esta invención en la fabricación de un medicamento para tratar o evitar un cáncer cerebral, un tumor cerebral y/o una metástasis cerebral en un sujeto.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un agente de administración que comprende un aptámero o conjugado de aptámeros como se describe en esta invención acoplado a un ARNip, ribozima o ADNzima.

En otra realización, la presente descripción proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un aptámero o conjugado de aptámeros, agente anticancerígeno o agente de administración como se describe en esta invención, junto con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 En un ejemplo, el aptámero se administra como una formulación liposomal.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un aptámero o conjugado de aptámeros como se describe en esta invención o el agente de diagnóstico como se describe en esta invención para su uso en formación de imágenes moleculares de cáncer cerebral, tumor cerebral o metástasis cerebral.

10

La capacidad de penetración del tumor del conjugado de aptámeros de la presente invención proporciona una clara ventaja sobre los anticuerpos para la formación de imágenes moleculares de los tumores. Por ejemplo, el conjugado de aptámeros puede ser acoplado a un agente que facilita la detección y formación de imágenes de cáncer o tumores portadores de células que expresan EpCAM. Los ejemplos de agentes adecuados incluyen las etiquetas de detección

15

El aptámero o conjugado de aptámeros, agente de diagnóstico, agente anticancerígeno, agente de administración o la composición farmacéutica como se describe en esta invención se pueden utilizar solos o en combinación con otras modalidades de tratamiento. Por ejemplo, el aptámero o el conjugado de aptámeros, el agente de diagnóstico, el agente anticancerígeno, el agente de administración o la composición farmacéutica pueden utilizarse en combinación con la quimioterapia y/o la radioterapia. Si bien no se desea quedar ligado a la teoría, se postula que los agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos se pueden utilizar para reducir los tumores por el direccionamiento principalmente de células en rápido proceso de división que son normalmente las células de la progenie de las células madre cancerosas. El agente de diagnóstico puede utilizarse para determinar la efectividad de cualquier modalidad de tratamiento previo para eliminar las células madre cancerosas mediante la detección de la presencia o ausencia de células madre cancerosas en el tumor. El agente anticancerígeno, el agente de administración o la composición farmacéutica que contiene el aptámero o conjugado de aptámeros de la presente descripción se pueden administrar al sujeto para agotar específicamente las células que expresan EpCAM. Por consiguiente, el agente anticancerígeno, el agente de administración o la composición farmacéutica que contiene el aptámero o conjugado de aptámeros se pueden utilizar en conjunto con un tratamiento de quimioterapia o radioterapia o posterior a la quimioterapia o radioterapia. También se contempla que el aptámero o conjugado de aptámeros de la presente descripción se pueden combinar con uno o más aptámeros adicionales que se dirigen a un antígeno presente en una célula madre cancerosa.

25

30

Cada ejemplo de la descripción se tomará para aplicarse *mutatis mutandis* a un procedimiento de tratamiento, prevención o mejora del cáncer en un sujeto.

35

Cada ejemplo de la descripción se tomará para aplicarse *mutatis mutandis* a la formación de imágenes moleculares de los cánceres o tumores.

40 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático del modelo in vitro de la barrera hematoencefálica utilizada en esta invención.

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático que describe el truncamiento del aptámero del receptor anti-transferrina original. El aptámero original (A) fue seleccionado después de seis rondas de SELEX. Este se trunca a un aptámero más corto con una longitud de cincuenta pares de bases (B). Este fue truncado aún más por el inventor a una longitud de catorce nucleótidos para producir TfR1 (C).

45

La Figura 3 muestra la determinación de la K_D de aptámeros anti-TfR con células positivas para TfR (bEnd.3) y negativas para TfR (MOLT4). La curva superior en cada caso corresponde a células bEnd.3 y la curva inferior a las células MOLT4. Las curvas de unión se obtuvieron utilizando concentraciones de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 y 400 nM. La construcción utilizada se indica en la figura. (A) TfR1; (B) TfR2; (C) TfR3; (D) TfR4. Los datos presentados como intensidad media de fluorescencia $\pm$ error estándar de la media ($n=3$).

50

La Figura 4 muestra el aptámero de EpCAM en ADN de longitud completa (SEQ ID NO: 15) y estructuras de aptámero truncado Ep7, Ep8 y Ep9.

La Figura 5A-1 y A-2 muestra la determinación de las constantes de equilibrio de disociación (K_D) para la interacción de bucles truncados contra las estirpes celulares positivas para EpCAM, HT29 y HEY. Las curvas de unión representativas se determinaron a concentraciones variables de los aptámeros de EpCAM en ADN (20-200 nM) utilizando una densidad celular de 5×10^5 células/ml. Datos presentados como media $\pm$ EEM ($n=3$).

60

La Figura 5B muestra la determinación de las constantes de equilibrio de disociación (K_D) para la interacción de Ex Ep 7 extendido y Ex Ep 7 revuelto contra la estirpe celular de cáncer de ovario positiva para EpCAM, HEY. Los histogramas fluorescentes se determinaron a 0 y 100 nM de aptámeros de EpCAM en ADN utilizando una densidad celular de 5×10^5 células/ml.

La Figura 6A y B muestra la determinación de las constantes de equilibrio de disociación (K_D) para la interacción de bucles truncados contra las estirpes celulares negativas para EpCAM, HEK293T y K562. Las superposiciones fluorescentes representativas se muestran a 0 nM (Auto) y 100 nM de aptámeros de EpCAM en ADN utilizando una densidad celular de 5×10^5 células/ml.

La Figura 7 muestra imágenes confocales de células HT29 y HEY cultivadas teñidas con aptámeros marcados con TYE665. Longitud completa de Ep, aptámeros de Ep 7, Ep 8 y Ep L9 y Hoechst 33342. Barra de escala = 10 μ m.

La Figura 8 muestra imágenes confocales de células HEK293T, HT29 y HEY cultivadas teñidas con aptámeros marcados con TYE665. Aptámeros Ex Ep 7 y Scr Ex Ep 7 y Hoechst 33342. Barra de escala = 10 μ m

La Figura 9-1 y 9-2 muestra una determinación de la K_D de los aptámeros conjugados con células positivas para TfR (bEnd.3), positivas para EpCAM (HEY) y negativas para EpCAM (MOLT4). La curva superior en cada caso corresponde a células HEY y la curva inferior a las células bEnd.3. (A) Conjugado de aptámeros (Bi1); (B) conjugado de aptámeros (Bi2); (C) conjugado de aptámeros (Bi3). (D-F) Los histogramas de fluorescencia se obtuvieron utilizando concentraciones a 0 y 100 nM con células MOLT4. (D) Bi1; (E) Bi2; (F) Bi3. Datos presentados como media $\pm$ EEM (n=3).

La Figura 10 muestra la incubación del aptámero de TfR con la estirpe celular positiva para EpCAM (HEY). El aptámero de TfR3 se incubó con células HEY y se analizó utilizando (A) citometría de flujo (curvas de unión obtenidas utilizando concentraciones a 0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 y 400 nM. Datos presentados como media $\pm$ EEM (n=3)). Los resultados demuestran claramente una unión no específica.

La Figura 11 muestra imágenes fluorescentes de cuerpo entero (A) de los ratones inyectados con 2 nmoles de aptámero Bi1 o aptámero 6 (un conjugado de Bi3 y Bi1) inyectados a través de la vena de la cola y las imágenes fluorescentes del cerebro y el hígado (B). Cerebro (BA) de un ratón inyectado con aptámero 6, hígado (BC) de un ratón inyectado con aptámero 6 y cerebro (BB) de un ratón inyectado con aptámero 1.

La Figura 12-1 y 12-2 muestran la formación de imágenes in vivo de aptámeros bifuncionales. A los ratones se les inyectó 2 nanomoles de aptámero mediante una inyección en la vena de la cola. (A) Imágenes fluorescentes de cuerpo entero capturadas durante el periodo de incubación de 30 minutos después de la administración. i) Aptámero de control neg Bi1 (TENN) ii) aptámero de control pos Bi3 (TEPP) (B) 30 minutos después de la administración, los ratones fueron sacrificados y se extrajo el cerebro. i) Neg ii) Pos (N=2).

La Figura 13 muestra la biodistribución del aptámero unido a transferrina/EpCAM en el cerebro. Los ratones NOD/SCID recibieron una única inyección i.v. de 40 nmol/Kg de aptámero unido a transferrina/EpCAM con cuatro estructuras diferentes (TEPP: Bi3 transferrina⁺/EpCAM⁺; TEPN: transferrina⁺/EpCAM⁺; TENP: transferrina⁻/EpCAM⁺; TENN: Bi1 transferrina⁻/EpCAM⁻). La concentración de aptámeros, expresada como % de la dosis inyectada (DI) por mg de tejido, en los tejidos indicados fue determinada a los 30 min y a los 60 min después de la administración del agente mediante ELISA. Los datos son medias $\pm$ EEM (n = 3).

Clave para el listado de secuencias

SEQ ID NO: 1: secuencia consenso de ADN del conjugado de aptámeros de la presente descripción.

SEQ ID NO: 2: secuencia de ADN de un conjugado de aptámero Bi2

SEQ ID NO: 3: secuencia de ADN de un conjugado de aptámero Bi3

SEQ ID NO: 4: secuencia de ADN de un aptámero TfR1

SEQ ID NO: 5: secuencia de ADN de un aptámero TfR2

SEQ ID NO: 6: secuencia de ADN de un aptámero TfR3

SEQ ID NO: 7: secuencia de ADN de un aptámero TfR4

SEQ ID NO: 8: secuencia de ADN de un conjugado de aptámero Bi1

SEQ ID NO: 9: secuencia de ADN de un aptámero Ep7

5

SEQ ID NO: 10: secuencia de ADN de un conjugado de aptámeros (aptámero 6)

SEQ ID NO: 11: secuencia de ADN del aptámero Ep8

10 SEQ ID NO: 12: secuencia de ADN del aptámero Ep9

SEQ ID NO: 13: secuencia de ADN del aptámero Ep7 extendido (Ex Ep7)

SEQ ID NO: 14: secuencia de ADN del aptámero Ep7 extendido y revuelto (scr ex Ep7)

15

SEQ ID NO: 15: secuencia de ADN del aptámero de TfR de longitud completa de 64 mer.

SEQ ID NO: 16: secuencia de ADN del aptámero de EpCAM de longitud completa de 48 mer

20 SEQ ID NO: 17: secuencia de ADN del aptámero de TfR

SEQ ID NO: 18: secuencia de ADN del aptámero de TfR

SEQ ID NO: 19: secuencia de ADN del aptámero de TfR

25

Descripción detallada

Técnicas generales y definiciones seleccionadas

30 El término "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" se entiende que significa ya sea "X e Y" o "X o Y" y se tomará para proporcionar apoyo explícito a ambos significados o para cualquier significado.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se especifique o que el contexto exija lo contrario, al hacer referencia a una única etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia se entenderá que esta abarca uno y una pluralidad (es decir, uno o más) de dichas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.

35

Cada ejemplo descrito en esta invención debe aplicarse *mutatis mutandis* a todos y cada uno de los otros ejemplos de la descripción, a menos que se indique específicamente lo contrario.

40

Los expertos en la materia apreciarán que la descripción es susceptible a variaciones y modificaciones además de las que se describen específicamente. Se ha de entender que la descripción incluye todas dichas variaciones y modificaciones. La descripción también incluye todas las etapas, características o composiciones referidas a o indicadas en la presente memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o dos o más cualquiera de dichas etapas o características.

45

El alcance de la presente descripción no está limitado por los ejemplos específicos descritos en esta invención, que están destinados únicamente a fines de ejemplo. Los productos, composiciones y procedimientos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la descripción.

50

La presente descripción se lleva a cabo sin experimentación indebida utilizando, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, tecnología de ADN recombinante, biología celular e inmunología. Tales procedimientos se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, segunda edición (1989), totalidad de volúmenes I, II, y III; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I y II (D.N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, totalidad de texto; *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (MJ Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, totalidad de texto, y en particular los documentos en el mismo de Gait, ppl-22; Atkinson y col., págs. 35-81; Sproat y col., págs. 83-115; y Wu y col., págs. 135-151; 4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Flames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, totalidad de texto; *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (1986) IRL Press, Oxford, totalidad de texto; Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), totalidad de series, Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154; Barany, G.

55

60

and Merrifield, R.B. (1979) en *The Peptides* (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, págs. 1-284, Academic Press, New York. 12. Wunsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Wier, E., ed.), vol. 15, 4ª ed., Parts 1 and 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474; *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); y *Animal Cell Culture: Practical Approach*, Tercera Edición (John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, totalidad de texto.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto lo exija de otro modo, se entenderá que el término "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende/comprenden" implican la inclusión de una determinada etapa o elemento o número entero o grupo de etapas o elementos o números enteros, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

El término "consiste en" o "que consiste/n en" se entiende que significa que un procedimiento, proceso o composición de materia tiene las etapas y/o componentes citados y no hay etapas o componentes adicionales.

Como se utiliza en esta invención, el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad de peso, tiempo, dosis, etc., sirve para abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$, y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos descritos.

El término "aptámero", como se usa en esta invención, comprende una región monocatenaria similar a un bucle, y donde las regiones adyacentes a ambos extremos de la región monocatenaria, respectivamente, forman preferentemente una región de tallo bicatenaria. Un aptámero es conocido por comprender la llamada "estructura de tallo-bucle" similar a éste en muchos casos, y también es conocido por unirse específicamente a una sustancia diana principalmente a través de la región de estructura de bucle monocatenaria. Los tamaños de las regiones que son adyacentes a ambos extremos de la región monocatenaria y que forman la región bicatenaria entre sí no están restringidos, y preferentemente tienen 2 pb a 15 pb. La estructura secundaria del aptámero puede ser determinada fácilmente por un procedimiento convencional utilizando un ordenador. Como software para el análisis de la estructura secundaria del aptámero, se puede utilizar, por ejemplo, el software bien conocido Mfold, cuyo software está disponible gratuitamente en el servidor web de Mfold.

La región de tallo bicatenaria comprende bases de pares. Por ejemplo, las bases de pares pueden ser o bien pares de bases A-T o pares de bases C-G.

El término "conjugado de aptámeros", como se utiliza en esta invención, se refiere a una construcción que tiene actividad bifuncional. En particular, se refiere a una construcción que comprende al menos una "porción de unión a EpCAM" y al menos una "porción de unión a TfR". En un ejemplo particular, la construcción de aptámero comprende una porción de unión a EpCAM y una porción de unión a TfR. En un ejemplo, la porción de unión a EpCAM es un aptámero y la porción de unión a TfR es un aptámero. La porción de unión a EpCAM (aptámero) y la porción de unión a TfR (aptámero) pueden ser contiguas. Alternativamente, la porción de unión a EpCAM (aptámero) y la porción de unión a TfR (aptámero) pueden unirse a través de un enlazador. Ejemplos de enlazadores adecuados incluyen los que proporcionan flexibilidad para el conjugado de aptámeros. En un ejemplo, el conjugado de aptámeros es un aptámero de ADN. El término "conjugado de aptámeros" también abarca multímeros.

Por "porción de unión a TfR" se entiende parte del conjugado de aptámeros que es capaz de unirse a TfR y constituye una unión a la región de tallo y a la región de bucle. En un ejemplo, la porción de unión a TfR es un aptámero. La porción de unión a TfR es capaz de unirse a, o unirse específicamente a TfR.

Por "porción de unión a TfR" se entiende parte del conjugado de aptámeros que es capaz de unirse a TfR y constituye una unión a la región de tallo y a la región de bucle. En un ejemplo, la porción de unión a EpCAM es un aptámero. La porción de unión a EpCAM es capaz de unirse a, o unirse específicamente a EpCAM.

Por "aptámero de EpCAM" se entiende un aptámero que es capaz de unirse a EpCAM y constituye una unión a la región de tallo y a la región de bucle.

Como se utiliza en esta invención, el término "actividad de unión" y "afinidad de unión" se pretende que se refiera a la tendencia del aptámero o el conjugado de aptámeros (y/o porciones de unión a EpCAM y a TfR del mismo individualmente) para unirse o no unirse a una diana y describe la medida de la fuerza de la unión o afinidad del aptámero o conjugado de aptámeros y/o porciones de unión a EpCAM y a TfR del mismo para unirse a la diana. Las energéticas de dichas interacciones son significativas en "la actividad de unión" y "afinidad de unión" puesto que definen las concentraciones necesarias de socios que interactúan, las tasas a las que estos socios son capaces de

asociarse, y las concentraciones relativas de las moléculas unidas y libres en una solución. Las energéticas se caracterizan en esta invención a través de, entre otras formas, la determinación de una constante de disociación, K_D . Como se conoce en la técnica, una baja constante de disociación indica una unión y afinidad más fuertes de las moléculas entre sí. En un ejemplo, la constante de disociación es de al menos 10^{-6} M. En otro ejemplo, la constante de disociación es de al menos 10^{-8} y 10^{-9} M. La afinidad de unión también puede expresarse en términos de la constante de equilibrio de disociación (K_D) que representa la relación de la tasa de disociación del aptámero (K_{dis}) a la tasa de asociación del aptámero (K_{as}). Cuanto menor sea el valor de K_D valor, mayor es la afinidad del aptámero por su diana. Los valores de K_D se pueden medir por ejemplo utilizando cualquier diferencia de reflectividad de incidencia oblicua modulada por polarización (OI-RD) o Biacore.

10

Como se utiliza en esta invención, el término "muestra biológica" se refiere a una célula o población de células o una cantidad de tejido o fluido de un sujeto. Muy a menudo, la muestra se ha eliminado de un sujeto, pero el término "muestra biológica" también puede referirse a células o tejido analizados *in vivo*, es decir, sin la eliminación del sujeto. Una "muestra biológica" en el contexto de la presente descripción contendrá células tumorales del sujeto. Las muestras biológicas incluyen, entre otros, biopsias de tejido o biopsias de aguja obtenidas a partir del tumor cerebral. Las muestras pueden ser embebidas en parafina o tejido congelado. La muestra se puede obtener mediante la eliminación de una muestra de células de un sujeto, pero también se puede lograr mediante el uso de células aisladas previamente (por ejemplo, aisladas por otra persona), o mediante la realización de los procedimientos de la invención *in vivo*.

15

El término "acoplado a", como se usa en esta invención, pretende que abarque cualquier tipo de construcción por la que el conjugado de aptámeros se vincula, fija, intercala o une a un agente de detección, resto, ARNip, ribozima o ADNzima como se describe en esta invención. Los procedimientos para efectuar un acoplamiento serán conocidos por los expertos en la materia e incluyen, entre otros, la conjugación, la unión a través de péptido o enlazador de ADN o mediante síntesis química directa del ADN y el agente (por ejemplo, ADNzima) como una cadena entera.

25

El término "aislado", como se utiliza en esta invención, pretende referirse a la célula madre (por ejemplo, célula madre cancerosa), aislable o purificada a partir de otros componentes. Una célula aislada se refiere a una célula del entorno en el que se puede producir de forma natural. La célula aislada puede purificarse a cualquier grado relativo a su estado obtenible naturalmente.

30

El aptámero o conjugado de aptámeros de la presente descripción es preferentemente sintetizado químicamente utilizando procedimientos conocidos en la técnica. La referencia al término "aislado" en el contexto del conjugado de aptámeros se refiere a un aptámero que se purifica de otros componentes que pueden estar presentes durante la síntesis del aptámero (por ejemplo, procedimiento SELEX).

35

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende como una cantidad suficiente de aptámero o conjugado de aptámeros, agente anticancerígeno, agente de administración o composición farmacéutica según la presente descripción para reducir o inhibir el número de células madre cancerosas que expresan EpCAM y/o uno o más síntomas de cáncer. El experto en la materia será consciente de que una cantidad tal variará dependiendo de, por ejemplo, el sujeto particular y/o el tipo o la gravedad o el nivel de enfermedad. El término no se interpretará para limitar la presente descripción a una cantidad específica de aptámero o conjugado de aptámeros.

40

Como se utiliza en esta invención, el término "tratar" o "tratamiento" o "tratando" se entiende que significa la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de aptámero, conjugado de aptámeros, agente anticancerígeno, agente de administración o composición farmacéutica como se describe en esta invención y reducción o inhibición de al menos un síntoma de una afección clínica asociada con o causada por el cáncer.

45

Como se utiliza en esta invención, el término "prevenir" o "que previene" o "prevención" se entiende que significa la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de aptámero, conjugado de aptámeros, agente anticancerígeno, agente de administración o composición farmacéutica según la presente descripción y detención u obstaculización o retraso del desarrollo o progresión de al menos un síntoma de cáncer.

50

Como se utiliza en esta invención, el término "se une específicamente" se entiende que significa que el aptámero o conjugado de aptámeros reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula particular (marcador presente en la célula) de lo que lo hace con células alternativas (marcadores). Por ejemplo, un aptámero o conjugado de aptámeros que se une específicamente a una proteína diana se une a esa proteína o a un epítipo o fragmento inmunogénico de la misma con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración de la que se une a una proteína no relacionada y/o a epítopos o fragmentos inmunogénicos de la misma. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión específica.

55

La especificidad de la unión se define en términos de las constantes comparativas de disociación (K_D) o las constantes de equilibrio de disociación (K_D) del conjugado de aptámeros para su diana en comparación con la constante de disociación o constante de equilibrio de disociación con respecto al aptámero o conjugado de aptámeros y otros

60

materiales en el entorno o moléculas no relacionadas en general. Normalmente, la K_d o K_D para el aptámero con respecto a la diana será 2 veces, 5 veces, o 10 veces inferior a la K_d o K_D con respecto a la diana y al material no relacionado o material adjunto en el entorno. Incluso más preferentemente, la K_d o K_D será 50 veces, 100 veces o 200 veces inferior.

5 El término "EpCAM+" o "célula(s) que expresa(n) EpCAM", como se utiliza en esta invención se puede utilizar de manera intercambiable. El término abarca la expresión de la superficie celular del antígeno de EpCAM que puede ser detectado por cualquier medio adecuado. Cuando se hace referencia a una célula como positiva de un marcador dado, significa que puede ser que tenga una expresión baja (ba o débil) o alta (brillante, bri) de ese marcador, dependiendo
10 del grado en que el marcador esté presente sobre la superficie celular, donde los términos se relacionan con la intensidad de fluorescencia

Como se utiliza en esta invención, el término "sujeto" se entiende que significa cualquier sujeto, incluyendo un sujeto humano o no humano. En un ejemplo, el sujeto es un ser humano.

15 *Aptámeros*

Los aptámeros son oligonucleótidos pequeños que son capaces de unirse a una diana específica. Se unen al ligando complementario debido a la interacción de la estructura 3D con la diana de una manera similar a los anticuerpos, en
20 lugar de por apareamiento de bases complementarias. Los aptámeros tienen dos dominios únicos: la región de tallo no unida y el bucle de unión; y puede ser ADN o ARN. Los aptámeros de ADN son más estables y baratos que los aptámeros de ARN, pero los aptámeros de ARN tienen un intervalo más amplio de funciones (Shigdar S y col., (2011) British Journal of Haematology 155(1):3-13). Los aptámeros son producidos por un procedimiento conocido como Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX).

25 Los aptámeros tienen una serie de características que los hacen superiores a los anticuerpos para aplicaciones terapéuticas. En primer lugar, son más pequeños que sus homólogos de proteína de anticuerpo (5-25 kDa vs. 125 kDa), y por lo tanto son capaces de penetrar más profundamente en un tejido, e incluso a través del núcleo de un tumor (Shigdar S y col., (2013) Cancer Letters 330(1):84-95). También, a diferencia de los anticuerpos, los aptámeros
30 no han sido documentados para producir una respuesta inmunitaria. La producción de aptámeros es también un procedimiento más sencillo, ya que SELEX es un procedimiento *in vitro*, a diferencia de los anticuerpos, que son producidos utilizando el sistema inmunitario de un animal. Esto asegura que los aptámeros se puedan fabricar contra un amplio intervalo de epítomos y que no se limita a una variación entre lotes, ambos aspectos los hacen superiores a los anticuerpos.

35 Sin embargo, hay un número de limitaciones asociadas con los aptámeros. Los aptámeros tienen una semivida circulatoria reducida debido a dos factores. En primer lugar, son oligonucleótidos, que son susceptibles a la degradación por nucleasas. Por otra parte, el menor tamaño de los aptámeros los hace susceptibles a la filtración glomerular, y por lo tanto pasan fácilmente por la orina. Ninguna modificación post-SELEX de un aptámero tiene el
40 potencial de alterar la afinidad de unión. Los aptámeros también tienen problemas de administración, en parte debido a la repulsión del ácido nucleico por la membrana celular cargada negativamente.

Los aptámeros tienen el potencial de ser utilizados para una multitud de fines de una manera similar a los anticuerpos. Un aptámero ya ha sido aprobado por la FDA para su uso clínico en el tratamiento de la degeneración macular (Rinaldi
45 M y col., (2012) British Journal of Clinical Pharmacology 74(6):940-6), y varios están actualmente en ensayos clínicos para un intervalo de usos. Los estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* han ilustrado las aplicaciones terapéuticas de los aptámeros en el tratamiento de afecciones de diabetes con VIH y enfermedades priónicas. Estos anticuerpos químicos, como se conocen a veces, son especialmente prometedores en el campo de la investigación del cáncer, ya que se pueden utilizar para dirigirse a un marcador específico en la superficie de las células cancerosas para proporcionar
50 una carga útil diseñada para provocar un efecto citotóxico. Esta estrategia tiene el potencial para limitar la toxicidad sistémica de un régimen quimioterapéutico, centrándose en los fármacos hacia el sitio del cáncer. Si tal técnica pudiese aplicarse clínicamente, limitaría los efectos secundarios de los pacientes y permitiría el uso de una dosis farmacológica más alta. Además, los tratamientos dirigidos podrían ser dirigidos hacia las CMC tumorigénicas, lo que mejoraría los resultados del paciente.

55 *EpCAM*

Las células cancerosas presentan un perfil de expresión antigénica diferente a las células normales, y este patrón distinto puede convertirse en el centro de un programa de tratamiento contra el cáncer. Un número de marcadores de
60 superficie celular se expresa en niveles más altos en las células cancerosas, y, por lo tanto, pueden generarse aptámeros que se unirán a las células cancerosas. La molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) es una glicoproteína de membrana que se ha identificado como un marcador de tumores sólidos y CMC debido a sus altos

niveles (mil veces) de expresión en comparación con las células epiteliales normales (88-91). Curiosamente, un análisis inmunohistoquímico de 108 muestras de tumores secundarios ha descubierto que solo un 4 % carecía de expresión de EpCAM. Además, EpCAM se asocia con un mal pronóstico del paciente, lo cual no es sorprendente, dado que se ha relacionado con la proliferación celular y la metástasis (93-95).

5 EpCAM es una diana terapéutica ideal, puesto que en las células normales se expresa en el lado basolateral de la membrana epitelial, mientras que, en las células cancerosas, EpCAM se expresa en gran medida en la superficie apical. La terapéutica basada en anticuerpos ha sido capaz de explotar esta característica de la expresión de EpCAM, ya que EpCAM celular normal es menos prominente y menos expuesta, lo que significa que las células sanas no son
10 tan susceptibles a la unión del anticuerpo. Por ende, los efectos secundarios son limitados y la acción del fármaco se dirige hacia las células problemáticas.

Los estudios clínicos que involucran anticuerpos terapéuticos anti-EpCAM para el tratamiento del cáncer han observado el desarrollo de la pancreatitis aguda en pacientes. Sin embargo, este efecto secundario solo se observó
15 en anticuerpos con una alta afinidad. Esto sugiere que la identificación selectiva basada en aptámeros de EpCAM debe utilizar aptámeros con una afinidad de unión moderada a fin de limitar los efectos secundarios. EpCAM es una diana útil para la terapia contra el cáncer basada en aptámeros, especialmente para los tumores cerebrales, ya que el tejido cerebral normal es negativo para EpCAM (Amann M y col., (2008) Cancer Research 68(1):143-51). Por ende, si la BHE podría ser evitada, EpCAM sería una diana ideal para el tratamiento de las metástasis cerebrales y/o cáncer
20 cerebral.

Conjugados de aptámero-doxorrubicina

Con el fin de destruir las células cancerosas, un aptámero ha de conjugarse con algo que va a provocar un efecto
25 citotóxico. Una opción es conjugar el aptámero con un fármaco quimioterapéutico para destruir directamente las células cancerosas. La doxorubicina (dox) es un fármaco que ha sido conjugado con aptámeros. Debido a la estructura de dox antraciclina, se puede insertar fácilmente (alcanzando el equilibrio en cuestión de diez segundos) en la región de tallo de un aptámero, entre los pares de guanina-citosina (GC), con una mínima alteración en la afinidad de unión. Esto refleja el mecanismo de toxicidad de dox, ya que se intercala en el ADN de una célula, induciendo la
30 apoptosis. Los aptámeros se pueden genomanipular de manera que tengan una región de tallo extendida con un alto contenido en GC, permitiendo una mayor intercalación de dox. Se han producido conjugados de aptámero-dox que se internalizan en las células a través de RME y provocan un efecto citotóxico comparable a dox exenta y representan una toxicidad seis veces mayor contra las células cancerosas que las células normales. Una ventaja de este sistema es la liberación del fármaco mediada por pH. Estos conjugados son estables en pH de plasma (7,4) y cerebro (6,6-
35 7,2), pero se disocian tras la internalización en el entorno más ácido del endosoma.

Selección de aptámeros para una diana determinada

Los aptámeros que se unen a prácticamente cualquier diana particular se pueden seleccionar mediante el uso de un
40 procedimiento iterativo llamado SELEX™ (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial). El procedimiento se describe, por ejemplo en los documentos US 5270163 y US 5475096. El procedimiento SELEX™ se basa en la visión única de que los ácidos nucleicos tienen suficiente capacidad para formar una variedad de estructuras bidimensional y tridimensional y suficiente versatilidad química disponible dentro de sus monómeros para actuar como ligandos (es decir, formar pares de unión específica) con prácticamente cualquier compuesto químico, ya sea
45 monomérico o polimérico. Las moléculas de cualquier tamaño o composición pueden servir como dianas.

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

Los oligonucleótidos del conjunto incluyen preferentemente una porción de secuencia aleatorizada, así como secuencias fijas necesarias para la amplificación eficiente. Normalmente, los oligonucleótidos del conjunto de partida contienen secuencias fijas terminales en 5' y 3' que flanquean una región interna de 30-50 nucleótidos aleatorios. Los nucleótidos aleatorizados se pueden producir en varias maneras, incluyendo la síntesis química y la selección de
5 tamaños a partir de ácidos nucleicos celulares escindidos de forma aleatoria. La variación de secuencia en los ácidos nucleicos de prueba también se puede introducir o aumentar mediante mutagénesis antes o durante las iteraciones de selección/amplificación.

La porción de secuencia aleatoria del oligonucleótido puede ser de cualquier longitud y puede comprender
10 ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos y puede incluir nucleótidos o análogos de nucleótidos modificados o no naturales (véanse, por ejemplo los documentos US 5958691, US 5660985 y WO 92/07065). Los oligonucleótidos aleatorios pueden sintetizarse a partir de nucleótidos unidos a fosfodiéster utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Froehler y col., (1986). Nucl. Acid Res. 14:5399-5467 y Froehler y col., (1986) Tet. Lett. 27:5575-5578. Los oligonucleótidos aleatorios también se
15 pueden sintetizar utilizando procedimientos en fase de solución tal como los procedimientos de síntesis de triéster. Véase, por ejemplo, Sood y col., (1977). Nucl. Acid Res. 4:2557 e Hirose y col., (1978). Tet. Lett. 28:2449. Las síntesis típicas llevadas a cabo en el equipo de síntesis de ADN automatizada producen 10^{14} - 10^{16} moléculas individuales, un número suficiente para la mayoría de los experimentos en SELEX™.

20 La biblioteca de partida de oligonucleótidos puede ser generada por síntesis química automatizada en un sintetizador de ADN. Las secuencias parcialmente aleatorias se pueden crear mediante la adición de los cuatro nucleótidos en diferentes relaciones molares en cada etapa de adición.

La biblioteca de partida de oligonucleótidos puede ser bien ARN o ADN. En aquellos casos donde una biblioteca de
25 ARN se va a utilizar como la biblioteca de partida, ésta se genera mediante la transcripción de una biblioteca de ADN in vitro utilizando ARN polimerasa T7 o ARN polimerasas T7 modificadas y se purifica. La biblioteca de ARN o ADN se mezcla entonces con la diana en condiciones favorables para la unión y se somete a iteraciones de unión en escalón, partición y amplificación, utilizando el mismo esquema de selección general, para conseguir prácticamente cualquier criterio deseado de afinidad y selectividad de unión. Más específicamente, a partir de una mezcla que
30 contiene el grupo de partida de los ácidos nucleicos, el procedimiento de SELEX™ incluye las etapas que consisten en: (a) poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión; (b) particionar los ácidos nucleicos no unidos de aquellos ácidos nucleicos que se han unido específicamente a moléculas diana; (c) disociar los complejos de ácido nucleico-diana; (d) amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-diana para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en ligandos; y (e) reiterar las etapas de unión,
35 partición, disociación y amplificación a través de tantos ciclos como se desee para producir ligandos de ácido nucleico altamente específicos, de alta afinidad a la molécula diana. En aquellos casos donde se están seleccionando aptámeros de ARN, el procedimiento de SELEX™ comprende además las etapas que consisten en: (i) la transcripción inversa de los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-diana antes de la amplificación en la etapa (d); y (ii) la transcripción de los ácidos nucleicos amplificados de la etapa (d) antes de reiniciar el procedimiento.

40 Los ciclos de selección y amplificación se repiten hasta que se alcanza una meta deseada. Generalmente, esto es hasta que no se consigue ninguna mejora significativa en la afinidad de unión en la repetición del ciclo. Normalmente, las moléculas de aptámero de ácido nucleico se seleccionan en un procedimiento de 5 a 20 ciclos. Se sabe que existe una variedad de estructuras primarias, secundarias y terciarias de ácidos nucleicos. Las estructuras o motivos que se
45 han mostrado más comúnmente para participar en las interacciones de tipo no Watson-Crick se denominan bucles en horquilla, protuberancias simétricas y asimétricas, pseudonudos y combinaciones innumerables de los mismos. Casi todos los casos conocidos de tales motivos sugieren que pueden formarse en una secuencia de ácido nucleico de no más de 30 nucleótidos. Por esta razón, a menudo se prefiere que los procedimientos de SELEX™ con segmentos aleatorios contiguos se inicien con secuencias de ácidos nucleicos que contienen un segmento aleatorizado de entre
50 aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos.

El procedimiento de SELEX™ central ha sido modificado para alcanzar una serie de objetivos específicos. Por ejemplo, el documento US 5707796 describe el uso de SELEX™ en conjunto con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas, tales como ADN doblado. El documento US
55 5763177 describe procedimientos basados en SELEX™ para la selección de ligandos de ácido nucleico que contienen grupos fotorreactivos capaces de unirse y/o fotorreticularse a y/o fotoinactivar una molécula diana. Los documentos US 5567588 y US 5861254 describen los procedimientos basados en SELEX™ que logran una partición altamente eficiente entre oligonucleótidos que tienen alta y baja afinidad por una molécula diana. El documento US 5496938 describe procedimientos de obtención de ligandos de ácido nucleico mejorados después de haber realizado el
60 procedimiento de SELEX™. El documento US 5705337 describe procedimientos para unir covalentemente un ligando a su diana.

- Counter-SELEX™ es un procedimiento para mejorar la especificidad de ligandos de ácido nucleico a una molécula diana mediante la eliminación de secuencias de ligandos de ácido nucleico con reactividad cruzada a una o más moléculas no diana. Counter-SELEX™ está comprendido por las etapas que consisten en: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, donde los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad por la diana respecto a la mezcla candidata se pueden particionar del resto de la mezcla candidata; (c) particionar los ácidos nucleicos con aumento de la afinidad del resto de la mezcla candidata; (d) disociar los ácidos nucleicos con aumento de la afinidad de la diana; (e) poner en contacto los ácidos nucleicos con aumento de la afinidad con una o más moléculas no diana, de modo que los ligandos de ácido nucleico con afinidad específica para la(s) molécula(s) no diana se eliminan; y (f) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad específica solo para la molécula diana para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácidos nucleicos con una afinidad relativamente mayor y especificidad para la unión a la molécula diana. Como se ha descrito anteriormente para SELEX™, los ciclos de selección y amplificación se repiten según sea necesario hasta que se alcanza un objetivo deseado.
- En un ejemplo representativo, un aptámero se sintetiza en una columna de soporte sólido, utilizando técnicas convencionales tales como las descritas por Beaucage y col. (1981) Tetrahedr. Letters 22:1859-1862 y Sinha y col., (1984) Nucleosides and Nucleotides 3:157- 30 171. Alternativamente, si se utiliza una síntesis a gran escala, el aptámero puede ser realizado por ampliación a escala del procedimiento de soporte sólido o el aptámero se puede realizar mediante el uso de técnicas en fase de solución, particularmente si el producto final deseado es un oligonucleótido relativamente corto. Un material de partida para el procedimiento de síntesis puede ser un oligorribonucleótido de ARN no tritilado en 5' o análogo de la estructura primaria deseada, que preferentemente puede tener bases protegidas, y que se une preferentemente a un soporte sólido. Cualquiera de los grupos protectores utilizados convencionalmente puede ser utilizado. Normalmente se utiliza N 6-benzoil para adenina, N 4-benzoil para citosina, N 2-isobutiril para guanina y N 2-benzoil para 2-amino purina. Otros grupos protectores útiles incluyen fenoxiacetilo (PAC) y t-butoxiacetilo (TAC). Convenientemente, se deben utilizar cuantos más grupos de protección lábiles de base para la síntesis del aptámero; los expertos en la materia conocen estos grupos. Tales grupos pueden ayudar a impedir la hidrólisis de tri- o difosfatos generados, que son generalmente bastante estables en condiciones básicas, pero podrían estar sujetos a alguna hidrólisis. Otras modificaciones previstas se describen en la patente de Estados Unidos N.º 6.011.020, e incluyen, entre otros, la incorporación de moléculas que mejoran la biodisponibilidad, tales como PEG o colesterol a través de un enlace covalente.

Además, los análogos de nucleósidos, tales como 2'-desoxi, 2'-halo, 2'-amino (no sustituidos o mono- o disustituidos), 2'-mono, di- o trihalometilo, 2'-O-alquilo, alquilo sustituido con 2'-O-halo, 2'-alquilo, azido, fosforotioato, sulfhidrido, metilfosfonato, fluoresceína, rodamina, pireno, biotina, xantina, hipoxantina, 2,6-diamino purina, 2-hidroxi-6-mercaptopurina y bases de pirimidina sustituidas en la posición 6 con azufre o en la posición 5 con halo o grupos alquilo C₁₋₅, enlazadores abásicos, 3'-desoxi-adenosina así como otros "terminadores de cadena" disponibles o análogos "no extendibles" (en el extremo 3' del aptámero), y similares se pueden incorporar durante la síntesis. Además, varias etiquetas tales como ³²P o ³³P y similares se pueden incorporar del mismo modo durante la síntesis, dando como resultado nuevos análogos producidos por este procedimiento. Otras modificaciones previstas se divulgan en la patente de Estados Unidos. N.º 6.011.020, e incluyen, entre otros, la incorporación de caperuzas en 3', tal como una caperuza DT invertida, o una caperuza abásica invertida, o una combinación de las mismas.

Afinidad de unión de aptámeros

- La afinidad de unión describe la medida de la fuerza de adhesión o afinidad de las moléculas entre sí. La afinidad de unión del aptámero en esta solicitud con respecto a las dianas y otras moléculas se define en términos de la constante de disociación (K_d) o constante de equilibrio de disociación (K_D). La constante de disociación se puede determinar por procedimientos conocidos en la técnica y puede calcularse incluso para mezclas complejas por procedimientos tales como, por ejemplo, los que se exponen en Caceci, M., y col., Byte (1984) 9:340-362.
- Ejemplos de constantes de disociación de medición se describen por ejemplo en el documento US 7602495 que describe el análisis de resonancia de plasmón superficial, documentos US 6562627, US 6562627 y US 2012/00445849. En otro ejemplo, la constante de disociación se establece utilizando un ensayo de unión con filtro de nitrocelulosa con doble filtro, tal como el divulgado por Wong y Lohman, (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5428-5432.
- Se ha observado, sin embargo, que para algunos pequeños oligonucleótidos, la determinación directa de la constante de disociación es difícil, y puede conducir a engañosamente resultados satisfactorios. Bajo estas circunstancias, un ensayo de unión competitiva para la molécula diana u otra sustancia candidata puede llevarse a cabo con respecto a las sustancias conocidas por unirse a la diana o candidato. El valor de la concentración a la que se produce un 50 % de inhibición (K) es, en condiciones ideales, equivalente a K_D. Un valor K también se puede utilizar para confirmar que un aptámero de la presente invención se une a una diana.

Mejora de la estabilidad del aptámero

Un problema potencial encontrado en el uso de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos se manifiesta en que los oligonucleótidos en su forma fosfodiéster pueden degradarse rápidamente en los fluidos corporales por enzimas intracelulares y extracelulares tales como endonucleasas y exonucleasas antes del efecto deseado. La presente descripción también incluye análogos como se describe en esta invención y/o modificaciones adicionales diseñados para mejorar una o más características del aptámero, tales como la protección de la digestión con nucleasas.

Las modificaciones de oligonucleótidos contempladas en la presente descripción incluyen, entre otros, aquellas que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, hidrofobicidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática, y fluxionalidad a las bases de ligando de ácido nucleico o al ligando de ácido nucleico como un todo.

Las modificaciones para generar oligonucleótidos que son resistentes a las nucleasas también pueden incluir uno o más enlaces internucleotídicos sustitutos, azúcares alterados, bases alteradas, o combinaciones de los mismos. Tales modificaciones incluyen modificaciones de azúcar en la posición 2', modificaciones de pirimidina en la posición 5, modificaciones de purina en la posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracil, modificaciones de la cadena principal, modificaciones de fosforotioato o fosfato de alquilo, metilaciones, y combinaciones inusuales de apareamiento de bases, tales como isobases, isocitidina e isoguanosina; modificaciones en 3' y 5', tales como protección con caperuza; conjugación con un alto peso molecular, compuesto no inmunogénico; conjugación con un compuesto lipófilo; y modificación de la cadena principal de fosfato. Preferentemente, el aptámero comprende una timidina invertida en 3'.

En un ejemplo, el compuesto no inmunogénico de alto peso molecular conjugado con el aptámero de la presente descripción es polialquilenglicol, preferentemente polietilenglicol. En un ejemplo, la modificación de la cadena principal comprende la incorporación de uno o más fosforotioatos en la cadena principal de fosfato. En otro ejemplo, el aptámero de la presente descripción comprende la incorporación de menos de 10, menos de 6 o menos de 3 fosforotioatos en la cadena principal de fosfato.

La barrera hematoencefálica

El tratamiento de los cánceres o tumores cerebrales se complica por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE) que aísla los microentornos cerebrales de la circulación sistémica mediante la regulación estricta del paso de moléculas. Como tal, los fármacos quimioterapéuticos son apenas capaces de entrar en el cerebro, a pesar de que todavía pueden dañar cualquier parte del cuerpo. La BHE consiste en una monocapa de células endoteliales cerebrovasculares que recubren los microvasos cerebrales. Estos se unen firmemente entre sí por una variedad de moléculas de adhesión célula-célula, asociados tanto con la membrana, tal como claudinas, como al citoplasma. El último tipo, que incluye zona occludens, sirve para unir los citoesqueletos de las células adyacentes entre sí. Otros tipos de células también participan en la regulación de las propiedades de la BHE, incluyendo astrocitos y pericitos. Sin embargo, el componente más importante es la monocapa endotelial, que forma la barrera física a través de las uniones estrechas. La BHE se caracteriza por la expresión única de transportadores moleculares y enzimas especializadas que regulan el paso de sustancias dentro y fuera del parénquima cerebral.

Metástasis

Los tumores desprenden millones de células cada día, sin embargo, pocas de ellas van en los tumores de semillas a otros sitios en el cuerpo. Las razones de esta tasa de fracaso se deben a dos factores; el hecho de que las células desprendidas están en su mayoría muertas, y las células de entorno hostil se encuentran en la circulación. La metástasis exitosa implica dos procesos separados, la liberación de una célula a partir de la masa tumoral y la intravasación en los sistemas circulatorio o linfático, y la extravasación de la sangre y la colonización en otro tejido. Se cree que estas se producen a través de interruptores fenotípicos, que permiten que una célula migre en primer lugar, y después colonice otros tejidos. Este cambio morfológico implica la interconversión entre los rasgos epiteliales y mesenquimales.

Al igual que los fármacos anticancerígenos similares, las células metastásicas luchan para entrar en el parénquima cerebral debido a la presencia de la BHE. Como tal, es sorprendente que la extravasación en el cerebro es mensurable más tiempo que en otros órganos. Aunque aún quedan muchas incertidumbres sobre el mecanismo exacto de la metástasis cerebral, parece que las células cancerosas pasan a través de la BHE por la ruta paracelular, mediante la degradación de las uniones estrechas endoteliales y la navegación entre las células endoteliales.

La investigación realizada por Kienast y colaboradores (2010) Nat Med 16(1):116-22 ha sido crítica en la aclaración de los procesos por los que las células cancerosas entran en el cerebro. Utilizando microscopia de barrido por láser y

multifotones se identifican cuatro fases distintas. En primer lugar, una célula cancerosa es frenada en los capilares del cerebro y permanece potencialmente así durante días. Es importante destacar que esto se produce debido a las limitaciones en el diámetro de los microvasos en lugar de las propiedades adhesivas de la célula. Mientras, en este estado estático, la célula experimenta cambios morfológicos, que ejercen presión mecánica sobre la BHE. La segunda etapa es la extravasación en el tejido cerebral, que implica enzimas, tales como metaloproteasas de la matriz que superan la defensa natural de la BHE contra tales enzimas y perturban las uniones estrechas endoteliales. A continuación, es importante que una célula cancerosa se adhiera al lado abluminal de la BHE de una manera similar a los pericitos. A partir de aquí, las células proliferan por cooptación de la vasculatura existente o mediante la promoción de la formación de neovasculatura mediante angiogénesis.

10

Utilidad de los aptámeros

El aptámero y conjugados de aptámeros de la presente descripción se pueden utilizar como ligandos de afinidad para separar y purificar moléculas diana (por ejemplo células portadoras de EpCAM), como sondas para rastrear, controlar, detectar y cuantificar moléculas diana (por ejemplo células portadoras de EpCAM), o para bloquear, permitir, activar o catalizar reacciones que son fisiológicamente relevantes para lograr el efecto terapéutico. Pueden actuar como agente farmacéutico, se unen a una diana específica y dirigen moléculas específicas a un sitio deseado.

15

El aptámero y conjugados de aptámeros de la presente descripción pueden utilizarse en los procedimientos in vitro, por ejemplo para las mezclas de purificación con afinidad para purificar moléculas diana (por ejemplo células portadoras de EpCAM). Los aptámeros son ideales para separaciones cromatográficas de moléculas diana (por ejemplo células portadoras de EpCAM) de los contaminantes y para la purificación de moléculas diana a partir de cultivos celulares o extractos celulares.

20

En un ejemplo, el aptámero y conjugados de aptámeros de la presente descripción se pueden utilizar como agentes de captura para unirse o inmovilizar una diana (por ejemplo células portadoras de EpCAM) en un soporte sólido. El soporte sólido puede estar comprendido por sustratos que tienen la estructura y la composición comúnmente asociada con filtros, obleas, virutas de la oblea, membranas y películas delgadas.

25

Sin embargo, se contempla que el soporte sólido puede estar comprendido por sustratos, que incluyen, entre otros, resinas, resinas de afinidad, perlas magnéticas o poliméricas, o cualquier reactivo de detección de diagnóstico, para capturar o inmovilizar reactivos para diagnóstico, detección o estudios cuantitativos.

30

Los soportes sólidos pueden comprender cualquier material dependiendo del uso deseado, incluyendo, entre otros, superficies y materiales de metal, vidrio, tales como materiales de acero, cerámicos o poliméricos tales como polietileno, polipropileno, poliamida, y fluoruro de polivinilideno, etc., o combinaciones de los mismos.

35

Aislamiento y purificación de células madre cancerosas que expresan EpCAM

Las células madre cancerosas se pueden derivar de cualquier tipo de cáncer que comprende células madre tumorogénicas, es decir, células que tienen una capacidad de proliferar extensivamente o de forma indefinida, y que dan lugar a la mayoría de las células cancerosas. Dentro de un tumor establecido, la mayoría de las células han perdido la capacidad de proliferar extensivamente y formar nuevos tumores, y un pequeño subconjunto de células madre cancerosas proliferan para regenerar así las células madre cancerosas, así como dan lugar a las células tumorales que carecen de potencial tumorigénico. Las células madre cancerosas pueden dividirse de forma asimétrica y simétrica y pueden mostrar tasas variables de proliferación. Las células madre cancerosas pueden incluir células de amplificación de tránsito o células progenitoras que tienen propiedades de células madre readquiridas.

40

45

Entre los cánceres representativos de los que se pueden aislar las células madre cancerosas que expresan EpCAM se encuentran los tumores cerebrales o las metástasis cerebrales derivadas de un cáncer primario, incluyendo, entre otros, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, sinovioma, linfagioendoteliosarcoma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

55

60

Adicionalmente, la metástasis cerebral puede ser derivada de un tumor primario o cáncer seleccionado de entre

tumores malignos hematopoyéticos, tales como linfomas y leucemias de células B, incluyendo linfoma de no Hodgkin (LNH) de bajo grado/folicular, LNH linfocítico pequeño (LP), LNH de bajo grado/folicular intermedio, LNH difuso de grado intermedio, LNH inmunoblástico de alto grado, LNH de células no escindidas pequeñas de alto grado, LNH de enfermedad voluminosa y macroglobulinemia de Waldenstrom, leucemia leucocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia monocítica, leucemia mielógena y leucemia promielocítica.

Las células madre cáncer cancerosas portadoras de EpCAM se pueden seleccionar utilizando el aptámero o conjugados de aptámeros como se describe en esta invención. Por ejemplo, los aptámeros que están acoplados a colorantes fluorescentes se pueden utilizar para la selección positiva de células madre cancerosas. También se sabe que EpCAM se expresa en algunas células normales. Sin embargo, se cree que la expresión de EpCAM se regula positivamente en las células madre cancerosas. Los marcadores de células madre cancerosas se expresan normalmente en un nivel que es al menos aproximadamente 5 veces mayor que las células diferenciadas del mismo origen o células no tumorígenicas, por ejemplo, al menos aproximadamente 10 veces mayor, o al menos aproximadamente 15 veces mayor, o al menos aproximadamente 20 veces mayor, o al menos aproximadamente 50 veces mayor, o al menos aproximadamente 100 veces mayor. El procedimiento de selección puede incluir también marcadores de selección negativa que pueden ser utilizados para la eliminación de estas células cancerosas en la población que no son células madre cancerosas.

Se entenderá que, en la realización de la presente descripción, la separación de las células portadoras de EpCAM puede efectuarse mediante un número de procedimientos diferentes. Por ejemplo, el aptámero o conjugado de aptámeros de la presente descripción puede estar fijado a un soporte sólido para permitir una separación bruta. Varias técnicas de diferente eficacia pueden ser empleadas dependiendo de la eficiencia de separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y velocidad de rendimiento y la necesidad de un equipo sofisticado y/o habilidades técnicas. Los procedimientos para el aislamiento o purificación pueden incluir, pero sin limitación, separación magnética utilizando perlas magnéticas recubiertas con aptámero, cromatografía de afinidad y "purificación" con aptámero fijado a una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan un aislamiento o purificación precisa incluyen, entre otros, FACS. Los procedimientos para llevar a cabo FACS serán evidentes para los expertos en la materia.

30 *Enriquecimiento de células que expresan EpCAM*

En un ejemplo, las células que expresan EpCAM se enriquecen a partir de una muestra biológica obtenida de un sujeto. Normalmente, el sujeto será uno que tiene un tumor cerebral o se sospecha que tiene un tumor cerebral o metástasis cerebral que contiene células madre cancerosas. El término "enriquecido" o "enriquecimiento" o variaciones de los mismos se utilizan en esta invención para describir una población de células en la que la proporción de un tipo celular particular es decir células madre cancerosas) aumenta en comparación con una población de células no tratada (por ejemplo, células en la muestra).

En un ejemplo, una población enriquecida para las células madre cancerosas comprende al menos aproximadamente 0,1 % o 0,5 % o 1 % o 2 % o 5 % o 10 % o 15 % o 20 % o 25 % o 30 % o 50 % o 75 % de células madre cancerosas portadoras de EpCAM. En este sentido, el término "población de células enriquecidas que comprende células madre cancerosas" se tomará para proporcionar soporte explícito para el término "población de células que comprende X % de células madre cancerosas", donde X % es un porcentaje tal como se menciona en esta invención. En un ejemplo, la población de células se enriquece a partir de una preparación celular que comprende células EpCAM+ en forma seleccionable. A este respecto, se entenderá que el término "forma seleccionable" significa que las células expresan un marcador (por ejemplo, un marcador de superficie celular) que permite la selección de células portadoras de EpCAM.

Diagnóstico del cáncer utilizando conjugados de aptámeros

El aptámero y los conjugados de aptámeros de la presente descripción se pueden utilizar in vitro con fines de diagnóstico para determinar la presencia de células madre cancerosas en tejido maligno. El procedimiento implica el examen de una muestra biológica para la presencia de células madre cancerosas que expresan EpCAM+. Por ejemplo, la muestra biológica puede ponerse en contacto con un aptámero marcado de la presente descripción y se determina la capacidad del aptámero para unirse específicamente a las células en la muestra. La unión por el aptámero indica la presencia de una célula portadora de EpCAM. En un ejemplo, la célula portadora de EpCAM es una célula madre cancerosa.

El conjugado de aptámeros de la presente descripción también se puede utilizar para localizar un tumor que expresa EpCAM+ in vivo mediante la administración a un sujeto de un aptámero aislado de la presente descripción que está marcado con un grupo indicador que proporciona una señal detectable. Los aptámeros unidos se pueden detectar entonces utilizando citometría de flujo, microscopia, gammagrafía externa, tomografía de emisión, formación de imágenes ópticas o exploración radionuclear. El procedimiento se puede utilizar para representar un cáncer en un

sujeto con respecto a la extensión de la enfermedad y para controlar los cambios en respuesta a la terapia.

La detección de las células madre cancerosas puede facilitarse por acoplamiento del aptámero o conjugado de aptámeros a una etiqueta detectable. Los ejemplos de etiquetas detectables incluyen diversas enzimas, grupos
 5 prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, etiquetas densas en electrones, etiquetas para IRM y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa. Los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelifona, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de
 10 dansilo o ficoeritrina. Un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol. Los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina, y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{18}F , ^{64}Cu , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{124}I , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{82}Rb o ^3H .

El etiquetado en el extremo 3' del aptámero se puede lograr, por ejemplo, por extensión con plantilla utilizando
 15 polimerasa Klenow, por ligamiento mediado por ARN/ADN T4 y por desoxinucleotidil transferasa terminal. El etiquetado en el extremo 5' se puede lograr mediante la suplementación de la mezcla de transcripción in vitro con un exceso de GTP-13-S, cuyo tiol se puede utilizar entonces para unir biotina. Además, la conjugación química directa de un grupo(s) adecuado(s) para ya sea el extremo en 5' o 3' se puede utilizar para etiquetar los aptámeros.

20 *Agente anticancerígeno de la presente descripción*

El aptámero o conjugados de aptámeros de la presente descripción se pueden conjugar además a un resto y se utilizan para dirigir el resto a las células EpCAM+, preferentemente células madre cancerosas. Los ejemplos de restos incluyen
 25 toxinas, radionúclidos o agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar para destruir las células madre cancerosas.

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

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

Muchas toxinas peptídicas tienen un dominio de unión al receptor eucariota generalizado; en estos casos, la toxina
 40 debe ser modificada para impedir que se destruyan las células no portadoras de EpCAM (por ejemplo, para impedir la destrucción de las células no portadoras de EpCAM pero que tienen un receptor para la toxina no modificada). Tales modificaciones se deben hacer de una manera que preserva la función citotóxica de la molécula. Las toxinas potencialmente útiles incluyen, entre otros, la toxina de la difteria, toxina del cólera, ricina, toxina similar a O-Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-1I v), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina del tétanos, exotoxina de
 45 Pseudomonas, alorina, saponina, modicina y gelanina. Otras toxinas incluyen factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa) y linfotoxina (LT). Otra toxina que tiene actividad antitumoral es la caliqueamicina gamma 1, un antibiótico antitumoral que contiene diino-eno con una potencia considerable contra los tumores (Zein N y col., (1988). Science 240:1198-201).

Como ejemplo, la toxina de la difteria (cuya secuencia es conocida) se puede conjugar con los conjugados de
 50 aptámeros de la presente descripción. La molécula de toxina de la difteria natural es secretada por Corynebacterium diphtheriae y consiste en varios dominios funcionales que se pueden caracterizar, empezando por el extremo amino-terminal de la molécula, como un fragmento enzimáticamente activo A (AA 1-193) y el fragmento B (AA 194-535) que incluye un dominio de translocación y un dominio de unión a una célula generalizado (AA 475-535).

El aptámero y el resto de toxina se pueden vincular en cualquiera de varias maneras que serán conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, un procedimiento de conjugación de un aptámero a una toxina (gelonina) se describe en Chu TC y col., (2006) Cancer Res 6(12):5989-5992. El resto puede ser también un modulador del sistema
 60 inmunitario que, o bien activa o bien inhibe el sistema inmunitario del cuerpo a nivel local. Por ejemplo, las citocinas, por ejemplo linfocinas, tales como IL-2, administradas a un tumor pueden provocar la proliferación de linfocitos T citotóxicos o células asesinas naturales en la proximidad del tumor.

El resto o grupo indicador puede ser también una molécula radioactiva, por ejemplo, un radionucleótido, o el llamado sensibilizador, por ejemplo una molécula precursora que se vuelve radioactiva en condiciones específicas, por ejemplo boro cuando se expone a un haz de neutrones de baja energía, en la llamada "terapia por captura de neutrones de boro" (TCNB) como se describe en Barth y col., (1990). Scientific American Oct 1990:100-107 Los compuestos con
5 tales porciones efectoras radioactivas se pueden utilizar tanto para inhibir la proliferación de las células madre cancerosas en el tumor como para etiquetar las células madre cancerosas para los fines de formación de imágenes.

Los radionucleótidos son moléculas radiactivas de un solo átomo que pueden emitir o bien partículas α , β , o γ . Los emisores de partículas alfa son preferidos a los emisores de partículas β , o γ , debido a que liberan emisiones de
10 energía mucho más altas a través de una distancia más corta, y por lo tanto son eficientes sin penetrar de manera significativa, y dañan los tejidos normales. Los radionucleidos emisores de partículas adecuados incluyen ^{211}At , ^{212}Pb , y ^{212}Bi .

La molécula radioactiva ha de estar estrechamente vinculada al aptámero ya sea directamente o por un quelato
15 bifuncional. Este quelato no ha de permitir la elución y, por tanto, la liberación prematura de la molécula radioactiva in vivo. Waldmann, Science, 252:1657-62 (1991). Como ejemplo, para adaptar TCNB a la presente invención, un isótopo estable de boro, por ejemplo, boro 10, puede seleccionarse como la fracción antitumoral o porción efectora del compuesto. El boro será administrado a y concentrado en o sobre las células tumorales por la unión específica del aptámero a la célula madre cancerosa. Después de un tiempo que permite que una cantidad suficiente de boro se
20 acumule, se pueden obtener imágenes del tumor e irradiarse con un haz de neutrones de baja energía, que tiene una energía de aproximadamente de 0,025 eV. Si bien esta irradiación de neutrones, por sí misma, provoca poco daño a ya sea el tejido sano que rodea el tumor, o al propio tumor, el boro 10 (por ejemplo, en la superficie de una célula tumoral) capturará los neutrones, formando así un isótopo inestable, boro 11. El boro 11 instantáneamente se fisiona produciendo 7 núcleos de litio y una energética de partículas, aproximadamente 2,79 millones eV. Estas partículas
25 pesadas son una forma altamente letal, pero muy localizada, de radiación, ya que las partículas tienen una longitud de trayectoria de solo aproximadamente un diámetro de célula (10 micrómetros).

Agente de administración de la presente descripción

30 Los conjugados de aptámeros de la presente descripción se pueden utilizar para la administración de ARNip, ribozima, o ADNzima a las células. Ejemplos de ARNip, ribozima o ADNzima adecuados dependerán de las circunstancias. Ejemplos de ARNip, ribozimas, o ADNzimas que son adecuados para su uso según la presente descripción incluyen aquellos que se dirigen a los transportadores de membrana de casete de unión a ATP diana, genes para mantener la capacidad de las células madre (Bmi-1, Notch 1, Sox 2, Oct-4, Nanog, β -catenina, Smo, nestina, ABCG2, Wnt2 y SCF,
35 etc.), GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), y survivina.

A modo de ejemplo, esto ha sido demostrado en la técnica anterior utilizando un aptámero anti-PSMA. Basándose en el conocimiento de que PSMA se internaliza a través de hoyos recubiertos con clatrina para endosoma, se postuló que
40 el aptámero anti-PSMA llevaría el ARNip fijado a las células que expresan PSMA, y el aptámero unido a ARNip a la proteína PSMA tendría acceso a la célula a través de la internalización. A continuación, la porción de ARNip sería objeto de tratamiento por el complejo Dicer y suministrada a la vía de silenciamiento génico mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Tres grupos han utilizado diferentes estrategias para lograr esto. Chu y col., (2006) Nucleic Acids Res 34, e73 describen un procedimiento de conjugación mediado por un puente de biotina-estreptavidina para ensamblar el aptámero anti-PSMA y el ARNip. McNamara y col., (2006) Nat Biotechnol 24, 1005-
45 1015 utilizaron una estrategia de quimera de aptámero con "solo ARN"-ARNip para vincular el aptámero y el ARNip. En un estudio posterior de Wüllner y col., (2008). Curr. Cancer Drug Targets 8:554-565, los autores utilizaron el aptámero anti-PSMA para administrar ARNip de factor de elongación eucariótico 2 (EEF2) a células de cáncer de próstata positivas para PSMA, los aptámeros bivalentes de PSMA se utilizaron para este fin. Los autores demostraron que, en comparación con la quimera anti-PSMA-ARNip monovalente, la potencia de atenuación génica de la
50 construcción de aptámero bivalente fue superior. Los conjugados de aptámeros de la presente descripción también se pueden utilizar para administrar la carga a células madre cancerosas que expresan EpCAM+ en una variedad de tumores sólidos. La gelonina es una toxina ribosómica que puede inhibir el proceso de síntesis de proteínas y es citotóxica. Sin embargo, es una membrana impermeable y necesita un posicionador para su entrada celular. Por lo tanto, los conjugados de aptámeros de la presente descripción pueden ser utilizados para administrar una carga útil
55 tóxica impermeable de membrana a las células madre cancerosas. La resistencia del tumor a agentes quimioterapéuticos citotóxicos se debe, en parte, a la administración insuficiente y la absorción, y más importante, el flujo por las células cancerosas. La nanopartícula biodegradable (NP) derivada de ácido poli(D-L-láctico-co-glicólico) PLGA fue utilizada para abordar este problema como se describe en Dhar y col., (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:17356-17361. Brevemente, el cisplatino se convirtió en su profármaco, compuesto Pt(IV), mediante la introducción
60 de dos cadenas de alquilo. Esto aumentó la hidrofobicidad del compuesto y facilitó el procedimiento de su empaquetado dentro del núcleo hidrófobo de la NP. El polietilenglicol (PEG) se utilizó como un copolímero durante la etapa de nanoprecipitación para sintetizar la nanopartícula PLGA-PEG. La superficie de PLGA-PEG-NP estaba

decorada con un aptámero de PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata). La NP fue sometida a endocitosis cuando se incubó con células LNCaP, y el profármaco alquilado fue convertido en cisplatino por el proceso de reducción citosólica.

- 5 La presente descripción también se extiende al uso del aptámero o conjugados de aptámeros como agentes simultáneos de administración de fármacos y de formación de imágenes para los tumores cerebrales o metástasis cerebrales. Esto se puede conseguir mediante la conjugación del aptámero a la superficie de un punto cuántico fluorescente (PC). A continuación, el conjugado de aptámeros de PC se incubó con Dox para formar la nanopartícula PC-aptámero-Dox. Tanto Dox y PC son moléculas fluorescentes. Sin embargo, debido a su proximidad en la
- 10 nanopartícula de PC-aptámero-Dox, inactivan entre sí la fluorescencia por un mecanismo de transferencia de energía por resonancia de bifluorescencia (TERB). Por lo tanto, la nanopartícula PC-aptámero-Dox es no fluorescente. Sin embargo, la internalización de la nanopartícula PC-aptámero-Dox a través de la endocitosis mediada por PSMA en células cancerosas provoca la liberación de Dox de las nanopartículas PC-aptámero-Dox, que resulta en la recuperación de la fluorescencia por medio de tanto Dox como PC.

15 *Composiciones farmacéuticas*

- En un ejemplo de la presente descripción, el aptámero, conjugado de aptámeros, agente anticancerígeno o agente de administración de fármacos según la presente descripción se administran en forma de una composición que
- 20 comprende un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. La elección del excipiente o de otros elementos de la composición se puede adaptar según la vía y el dispositivo utilizado para la administración.

Los términos "vehículo" y "excipiente" se refieren a composiciones de materia que son convencionalmente utilizadas en la técnica para facilitar el almacenamiento, la administración, y/o la actividad biológica de un compuesto

25 activo/aptámero (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., Mac Publishing Company (1980). Un vehículo también puede reducir cualquier efecto secundario no deseado del compuesto activo/aptámero. Un vehículo adecuado es, por ejemplo, estable, por ejemplo, incapaz de reaccionar con otros ingredientes en el vehículo. En un ejemplo, el vehículo no produce efectos adversos locales o sistémicos significativos en receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas para tratamiento.

- 30 Los vehículos adecuados para la presente descripción incluyen los convencionalmente utilizados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, solución de Ringer, una solución tamponada, hialurano y glicoles, que son vehículos líquidos ejemplares, en particular (cuando son isotónicos) para soluciones. Los vehículos y excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, celulosa, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza,
- 35 gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares.

- Otros aditivos generales, tales como un agente antioxidante, solución tamponada, agente bacteriostático etc., pueden ser añadidos. Con el fin de su preparación, se pueden añadir adicionalmente soluciones inyectables, píldoras, cápsulas,
- 40 gránulos o comprimidos, diluyentes, agentes dispersantes, tensioactivos, aglutinantes y lubricantes.

El agente anticancerígeno o agente de administración de fármacos que contiene el aptámero de la presente descripción se puede administrar al sujeto para la administración al cerebro según los procedimientos conocidos en la técnica. La administración puede ser por medio parental (por ejemplo, inyección intravenosa, hipodérmica, local o

45 peritoneal). Alternativamente, la administración puede ser intranasal. En algunas realizaciones, el aptámero o conjugado de aptámeros se proporciona en forma de una nanopartícula o liposoma. Por ejemplo, las nanopartículas pueden ser funcionalizadas con un aptámero o conjugado de aptámeros de la presente descripción para la administración diana de fármacos.

- 50 La dosificación efectiva del agente anticancerígeno puede ser determinada según el peso, edad, sexo, estado de salud, dieta, frecuencia de administración, procedimiento de administración, excreción y gravedad de una enfermedad. En un ejemplo, el agente anticancerígeno o agente de administración de fármacos contiene el conjugado de aptámeros en un 10-95 % en peso. En un ejemplo, el agente anticancerígeno o agente de administración de fármacos contiene el conjugado de aptámeros en un 25-75 % en peso.

- 55 La frecuencia de administración puede ser de una a varias veces al día. En un ejemplo, el contenido intracelular efectivo del aptámero es de aproximadamente 1 nM a 1000 nM. En otro ejemplo, el contenido intracelular efectivo del aptámero es preferentemente de 100 nM a 500 nM. Sin embargo, la dosificación del aptámero podría ser inferior o superior al intervalo anterior.

60 *Receptor de transferrina*

El receptor de transferrina (TfR; CD71) es una glicoproteína transmembrana que consiste en dos subunidades de 90 kDa. Un puente disulfuro enlaza estas subunidades y cada subunidad puede unirse a una molécula de transferrina (Tf). El TfR se expresa principalmente en hepatocitos, eritrocitos, células intestinales, monocitos, así como en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (BHE). Además, en el cerebro el TfR se expresa en las células epiteliales del plexo coroideo y en las neuronas. El TfR media la internalización de transferrina saturada por hierro por endocitosis mediada por receptor. Los estudios han demostrado que la afinidad de transferrina para su receptor depende del pH y la carga de hierro.

Tras la unión del ligando de transferrina al receptor, el complejo receptor-ligando se endocita a través de vesículas recubiertas con clatrina.

Combinaciones de aptámeros

La(s) molécula(s) de aptámero aislada(s) de la presente descripción puede(n) ser utilizada(s) solo o en combinación con uno o más aptámeros adicionales según cualquier procedimiento divulgado en esta invención. En un ejemplo, el(los) conjugado(s) de aptámeros de la presente descripción se puede(n) combinar con un aptámero que facilita la detección, purificación o enriquecimiento de células madre cancerosas.

Kits

La presente descripción también proporciona kits de diagnóstico para llevar a cabo los procedimientos divulgados en esta invención. En un ejemplo, el kit de diagnóstico incluye el agente de diagnóstico como se describe en esta invención para la detección de células que expresan EpCAM (por ejemplo células madre cancerosas).

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

EJEMPLOS

Procedimientos

Cultivo celular

Las estirpes celulares (Tabla 1) fueron adquiridas en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Invitrogen), suplementado con suero fetal bovino al 10 % (SFB) a 37 °C en una atmósfera del 5 % de CO₂. Las estirpes celulares fueron células endoteliales cerebrales de ratón bEnd.3 (positivas para TfR), células de cáncer de ovario HEY (positivas para EpCAM) y células de leucemia MOLT4 (negativas para TfR, negativas para EpCAM). Las células se pasaron (utilizando 1 x tripsina para células adherentes) cuando sea necesario para los ensayos o según sea apropiado para mantener el número de células.

Tabla 1 Estirpes celulares

Células	Tipo	Propiedades	Medio de crecimiento
bEnd.3	Ratón cerebral endotelial	Adherente	DMEM con bajo nivel de glucosa (1g/l) y SFB al 10 %
HEY	Adenocarcinoma seroso papilar de ovario humano	Adherente	DMEM con SFB al 10 %
MOLT4	Leucemia linfoblástica aguda humana	Suspensión	DMEM con SFB al 10 %

Aptámeros

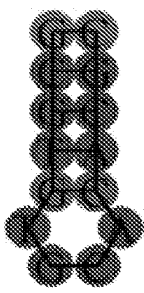
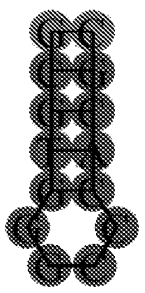
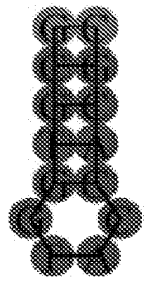
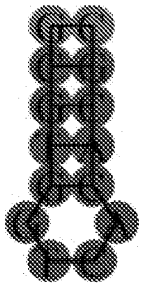
Los aptámeros se describen en la Tabla 2. Todos los aptámeros se marcaron con una dT inv 3' y un fluoróforo en el extremo 5' (TYE 665). Estos fueron todos sintetizados comercialmente (Integrated DNA Technologies). Se utilizaron

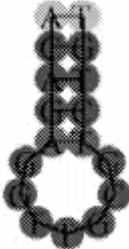
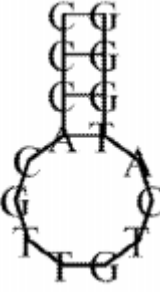
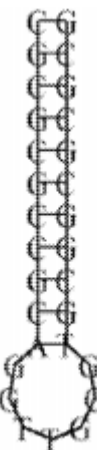
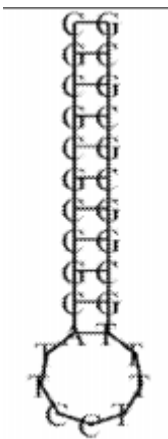
dos grupos diferentes de aptámeros. Cuatro aptámeros contra el TfR de ratón se ensayaron inicialmente. Después de esto, se generaron tres aptámeros conjugados, que incorporan algunos de estos aptámeros anti-TfR y un aptámero anti-EpCAM (Ep7) derivado de un aptámero de EpCAM más grande descrito en Song Y col., (2013) Analytical Chemistry 85(8):4141-9). El aptámero de Song y col., consiste en la siguiente secuencia:

5' CAC TAC AGA GGT TGC GTC TGT CCC ACG TTG TCA TGG GGG GTT GGC CTG 3' (SEQ ID NO: 16).

Dos aptámeros de EpCAM adicionales también se produjeron, Ep8 y Ep9 diseñados, que también se derivan del aptámero de EpCAM más grande que se describe en Song y col.

Tabla 2 Aptámeros

 TfR1 5' GCG TGT GCA CAC GC 3' (SEQ ID NO: 4)	 TfR2 5' GCG TGG GCC CAC GC 3' (SEQ ID NO: 5)
 TfR3 5' GCG TGG TAC CAC GC 3' (SEQ ID NO: 6)	 TfR4 5' GCG TGG TCA CAC GC 3' (SEQ ID NO: 7)
 Aptámero bifuncional 1 (Bi1) 5' GCG CGT GCA CGC GCT AAC GGA TTC CTT TTC CGT 3' (SEQ ID NO: 8)	 Aptámero bifuncional 2 (Bi2) 5' GCG CGG GCC CGC GCT AAC GGA GGT TGC GTC CGT 3' (SEQ ID NO: 2)

 Bifuncional 3 (Bi3) 5' GCG CGG TAC CGC GCT AAC GGA GGT TGC GTC CGT 3' (SEQ ID NO:3)	 Aptámero EpCAM (Ep7) 5' ACA GAG GTT GCG TCT GT 3' (SEQ ID NO: 9)
 Aptámero EpCAM (Ep8) 5' CCC ACG TTG TCA TGG G 3' (SEQ ID NO: 11)	 Aptámero EpCAM (Ep9) 5' GGG GTT GGC CCC 3' (SEQ ID NO: 12)
 Aptámero Ep7 extendido (ExEp7) 5' CGC GCG CCG CAG GTT GCG TGC GGC GCG CG 3' (SEQ ID NO:13)	 Aptámero Ep7 extendido y revuelto (ScrExEp7) 5' CGC GCG CCG CAT TCC TTT TGC GGC GCG CG 3' (SEQ ID NO:14)

i) *Determinación de la afinidad de unión de los aptámeros*

Con el fin de determinar la afinidad de unión (constante de equilibrio de disociación K_D) de los aptámeros. Se llevaron a cabo ensayos de unión para medir la unión a la proteína de EpCAM nativa expresada en la superficie celular. Los aptámeros se incubaron con las células a concentraciones que varían de 0 nM a 400 nM. Estos se analizaron posteriormente por citometría de flujo. Los aptámeros se descongelaron del almacenamiento (-20 °C) antes de su uso. Estos se diluyeron a continuación a través de diluciones en serie con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con el fin de alcanzar las concentraciones deseadas. PBS se suplementó con una concentración apropiada de $MgCl_2$ para el aptámero (1 mM para aptámeros anti-TfR; 5 mM para aptámeros conjugados). Los aptámeros se pliegan en sus estructuras 3D utilizando un termociclador (85 °C durante 5 minutos, lento enfriamiento a 22 °C durante 10 minutos y 37 °C durante 15 minutos).

Simultáneamente, las células subcultivadas se incubaron en tampón de bloqueo (PBS con SFB al 10 %, 1mg/ml de ASB, 0,1mg/ml de ARNt) durante 30 minutos. Después de la centrifugación, el tampón de bloqueo se eliminó y las células se resuspendieron en tampón de unión (PBS con SFB al 10 %, 1mg/ml de ASB, 0,1 mg/ml de ARNt). Las células (50 μ l) se incubaron después con los aptámeros (50 μ l) durante 30 minutos a 37 °C en un intervalo de concentraciones (0 nM, 20 nM, 40 nM, 60 nM, 80 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM). Después de esto, las células se lavaron en 100 μ l de PBS tres veces antes de la resuspensión final para citometría de flujo.

Los aptámeros se incubaron con las estirpes de células elegidas (células bEnd.3, células de ratón positivas para TfR; células HEY, estirpe celular de cáncer de ovario humano positiva para EpCAM, y células humanas MOLT4 negativas tanto para TfR como EpCAM) en un intervalo de concentraciones. Las células unidas a aptámeros se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson), contando 10.000 eventos en cada muestra, con el fin de determinar la afinidad de unión de los aptámeros. Se observaron células viables que presentan fluorescencia y se registró la intensidad media de fluorescencia. El valor para la concentración autofluorescente de 0 nM se restó de las otras figuras para tener en cuenta la fluorescencia de fondo (Li N y col., (2009) Journal of Proteome Research 8(5):2438-48). Los valores resultantes se utilizan luego para determinar la constante de disociación (K_D) mediante el software GraphPad Prism 3.

ii) *Determinación de la internalización del aptámero en células*

La microscopia confocal se utilizó como un medio de visualización de la internalización del aptámero en las células. Los aptámeros y las células se prepararon de la misma manera que se ha descrito anteriormente antes de que se mezclaran y se dejaron incubar a 37 °C. Los aptámeros se utilizaron a una concentración de 200 nM y se dejaron incubar durante 60 minutos. La concentración de los aptámeros conjugados (bifuncionales) fue de 400 nM y éstos se incubaron con las células durante 120 minutos. Diez minutos antes del final de la incubación, 2 μ l de tinción nuclear de Hoechst (10mg/ml) se añadieron a las células. Después, las células se lavaron tres veces con 100 μ l de PBS como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron en 20 μ l (8×10^5 células/pocillo) en un portaobjetos con 8 cámaras (Lab-Tek II, Nunc) para la visualización. Las células se incubaron en tampón de bloqueo durante 60 minutos, seguido de resuspensión en tampón de unión que contiene el aptámero y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Bisbencimida Hoechst 33342 (3 mg/ml) (Sigma) se añadió a las células durante los 10 min finales de incubación. La solución de aptámeros se eliminó y las células se lavaron tres veces durante 5 min, cada una en PBS antes de su visualización utilizando un microscopio confocal de barrido por láser FluoView FV10i (Olympus).

Con el fin de evaluar el mecanismo de captación celular, la internalización de un anticuerpo monoclonal anti-TfR de ratón de rata marcado con ficoetirina (R17217; Abcam) también se visualizó por microscopia confocal al coincubarlo con el aptámero a 1 μ g/ml durante 30 minutos.

50 *Modelo de barrera hematoencefálica in vitro*

Con el fin de evaluar la capacidad de los aptámeros que contienen TfR para pasar a través de una monocapa de células endoteliales a través del transporte mediado por el receptor (TMR), se produjo un modelo de BHE *in vitro* como se muestra esquemáticamente en la Figura 1. Insertos de Transwell (tereftalato de polietileno (PET) con poros con un diámetro de 0,4 μ m) dentro de una placa de 24 pocillos (Corning) se incubaron con 100 μ l de colágeno IV al 50 % durante 2 horas a 37 °C. Los matraces de células bEnd.3 se tripsinizaron para generar una única suspensión de células, y se contaron utilizando un hemocitómetro y azul de tripano para asegurar que una proporción suficiente de las células estaban vivas. Estas fueron luego centrifugadas y se resuspendieron en medios. Los pocillos se llenaron con 800 μ l de medios libres de suero y los insertos de Transwell se colocaron en la parte superior. Las células se sembraron a continuación en 90 μ l de medio libre de suero a una densidad de 1×10^6 células/cm² y se dejaron incubar a 37 °C. Las células se dejaron sedimentar durante 6 horas y después se añadieron 60 μ l de medios mejorados (glucosa con bajo nivel DMEM: F12 de Ham (1:1), (ambos libres de suero), hidrocortisona 550 nM, 32 μ M de cAMP,

17,5 μ M de aminofilina, 1 μ M de ácido retinoico, 5 μ g/ml de insulina, 2,75 μ g/ml de transferrina, 2,5 ng/ml de selenito sódico, 100 ng/ml de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico), 20 ng/ml de EGF (factor de crecimiento epidérmico)) (Wuest DM y col., (2013) Journal of Neuroscience Methods 212(2):211-21) a los Transwells. Los medios en ambos compartimentos fueron reemplazados al día siguiente con los medios mejorados con el fin de suplementar el crecimiento de la monocapa.

(i) *Mediciones de la resistencia eléctrica transendotelial*

Con el fin de evaluar la integridad de la membrana, se midió la resistencia eléctrica transendotelial (RETE) de los Transwells. Los electrodos de un voltajímetro epitelial EVOM2 (World Precision Instruments) se insertaron en ambas cámaras del modelo de BHE y la resistencia se registró en ohmios. Este valor se multiplicó acto seguido por el área del Transwell. A continuación, lo mismo se realizó utilizando un inserto de Transwell en blanco y se resta del valor previamente registrado con el fin de obtener la RETE en Qcm².

(ii) *Visualización de membranas de Transwell*

Los Transwells fueron aspirados de los medios antes de que sean enjuagados con cuidado con PBS. El metanol se añade entonces a los Transwells durante 5 minutos con el fin de fijar las células. Después, éste se eliminó y se añadió hematoxilina durante 5 minutos. Los Transwells se enjuagaron posteriormente con PBS y después se añadió alcohol acidificado. Después de otro enjuague con PBS, se añadió eosina para los Transwells durante 30 segundos. Los Transwells se visualizaron bajo un microscopio óptico (Olympus) antes y después de la tinción de hematoxilina y eosina.

(iii) *Cocultivo de HEY-bEnd.3 y permeabilidad de la barrera hematoencefálica del aptámero*

Las células HEY se subcultivaron y se contaron utilizando un hemocitómetro y azul de tripano a fin de evaluar el porcentaje de células vivas. Posteriormente, se diluyeron en medio DMEM a una concentración de 87.500 células/ml. Se eliminó el medio del compartimento inferior del modelo de BHE in vitro y se reemplazó con 800 μ l de la solución de células HEY, sembrando 70.000 células por pocillo. Estas se dejaron incubar durante la noche. A continuación, se eliminó el medio del compartimento superior de los Transwells y se pipetearon 100 μ l de aptámero a una concentración de 2 μ M en la parte superior de la membrana de Transwell. Después de una incubación de tres horas a 37 °C, los medios en el compartimento inferior se eliminaron y se centrifugaron. Las células se resuspendieron en 100 μ l de PBS y se añadieron 2 μ l de tinción nuclear de Hoechst (10 mg/ml) y se dejaron incubar durante diez minutos. Después, las células se lavaron tres veces en 100 μ l de PBS antes de visualizarse bajo un microscopio confocal (Olympus).

Análisis de datos

Los datos y resultados se analizaron utilizando GraphPad Prism 3 y se notificaron como error medio y estándar de la media (media $\pm$ EEM) a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1 Caracterización de aptámeros del receptor anti-transferrina

(i) Generación de aptámero de TfR

Los aptámeros de transferrina generados en esta invención se derivaron de un aptámero contra el receptor de transferrina de ratón (TfR) como se ha descrito anteriormente en Chen y col., (2008) PNAS 105(41):15908-13 y se muestra en la Figura 3A y B. Este diseño de aptámero original fue utilizado como una prueba de concepto para la transcitosi de un aptámero a través de la BHE. Los inventores truncan aún más el aptámero de TfR original de Chen y col., y que tiene el aptámero con la secuencia

5'

GAATTCCGCGTGTGCACACGCTCACAGTTAGTATCGCTACGTTCTTTGGTAGTCCGTTCCG

GGAT 3' (SEQ ID NO:15)

para generar el aptámero de TfR (Figura 2C y SEQ ID NO: 4)). Este entonces fue modificado posteriormente a través del intercambio de la secuencia del bucle de unión para producir tres versiones alternativas (designadas TfR2, TfR3 y TfR4) como se muestra en la Tabla 2. La estructura en 2D de los aptámeros anti-TfR se predijo con el software VIENA (Gruber AR y col., (2008) Nucleic Acids Research 36(Web server issue):W70-W4 a fin de garantizar que se mantenga sin cambios después de la alteración de la secuencia en el bucle de unión.

(ii) Determinación de la afinidad de unión al aptámero del receptor anti-transferrina

La afinidad de unión de un aptámero a un receptor diana es una característica importante de la molécula que tiene un impacto significativo en su uso como agente terapéutico. Las afinidades más altas permiten una absorción mayor en una célula, pero también pueden impedir la óptima distribución terapéutica de un fármaco a lo largo de un tumor y pueden correr el riesgo de efectos inespecíficos. Además, algunos aptámeros requieren solo una unión transitoria con el fin de llevar a cabo la función para la que estaban destinados. Este es el caso con los aptámeros anti-TfR que son diseñados en esta invención. A medida que estos se modifican de manera que se transcitosen a través de la BHE, y no simplemente para llegar a ser internalizados en las células endoteliales, es necesaria una afinidad de unión inferior.

Se determinaron las afinidades de unión de aptámeros TfR1, TfR2, TfR3 y TfR4 semicuantitativamente mediante citometría de flujo, utilizando células endoteliales cerebrales bEnd.3 de ratón como una estirpe celular positiva para TfR y las células de leucemia linfoblástica aguda MOLT4 que expresan el TfR humano, pero no el TfR de ratón (Sutherland R y col., (1981) PNAS 78(7):4515-9) como control negativo. Tres ensayos de unión independientes se realizaron para cada aptámero contra cada estirpe celular.

Los resultados del ensayo de unión indican que los cambios realizados en el bucle de unión a aptámero tuvieron un impacto variado en la afinidad de unión, aunque no en la medida en que cualquier aptámero perdió completamente la especificidad. Sorprendentemente, el aptámero con la afinidad de unión más baja fue el truncamiento original, TfR1 (Figura 3A; $KD = 5764 \pm 7117$ nM), en contraste con el aptámero que exhibió la unión más firme, TfR3 (Figura 3C; $KD = 365,6 \pm 83,28$ nM).

La afinidad de unión de los aptámeros también se midió contra una estirpe celular humana (MOLT4) como un control negativo. Aunque MOLT4 no expresa TfR, no se esperaba que cualquier unión específica, como la homología de secuencia de aminoácidos entre TfR humano y ratón sea solo el 77 % (Altschul SF y col., (1990) Journal of Molecular Biology). Los aptámeros mostraron unión no específica a las células MOLT4, al establecer que la confianza de la unión observada frente a las células bEnd.3 era de hecho específica.

(iii) Análisis cuantitativo de la internalización del aptámero del receptor anti-transferrina en células

La captación de estos aptámeros en células es un factor importante para determinar el potencial para su uso como agentes terapéuticos. Los aptámeros del receptor anti-transferrina generados en esta invención están diseñados para pasar a través de la BHE mediante la ruta de transcitosis activa. Por ende, es crítico asegurar que los aptámeros se están internalizando en células en lugar de simplemente fijando a la superficie celular. Esto se hizo mediante la visualización de la internalización de los aptámeros a una concentración de 200 nM en células bEnd.3 y MOLT4 durante el transcurso de una hora de incubación con microscopía confocal.

Los cuatro aptámeros anti-TfR fueron recogidos en las células endoteliales cerebrales positivas para TfR. Las células negativas para TfR no mostraron ninguna captación de aptámeros clara, al establecer confianza en la especificidad del proceso de internalización. Además, el aptámero internalizado tenía un patrón de tinción punteada, destacando una posible localización endosomal, que es indicativo de la captación celular activa.

(iv) Determinación de la especificidad de la captación del aptámero del receptor anti-transferrina

Los aptámeros son herramientas moleculares relativamente nuevas en el campo del diagnóstico y la terapéutica. Por ende, a pesar de sus muchas ventajas sobre las moléculas de unión a base de proteínas (véase la Tabla 1), los anticuerpos son una estrategia más aceptada para dirigirse a las células a través de los antígenos superficiales específicos. El rendimiento del aptámero con un anticuerpo correspondiente se comparó mediante el examen de captación en las células bEnd.3. Esto se hizo mediante la incubación de aptámero con afinidad más alta, TfR3, y el anticuerpo anti-TfR con las células bEnd.3 y observándolos a través de microscopía confocal.

Se observó la colocalización del aptámero TfR3 con el anticuerpo anti-TfR en las células bEnd.3 por microscopía. Un patrón de distribución muy similar se observó con el aptámero y el anticuerpo por toda la célula, proporcionando una indicación de que ambas moléculas entraron en la célula a través de la misma ruta.

(V) Análisis cualitativo de la trayectoria temporal de la internalización del aptámero del receptor anti-transferrina en células

Los aptámeros anti-TfR generados en esta invención están destinados a ser utilizados como agentes de administración de fármacos capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). En un entorno *in vivo* o clínico, éstos tendrían que pasar por el torrente sanguíneo y en la monocapa endotelial de la BHE antes de salir por el otro lado en el parénquima cerebral. Teniendo en cuenta esto, es vital que no solo sean capaces de que entren células a través de los procesos de transporte activo, sino también puedan exocitarse de nuevo. Por lo tanto, un experimento de

internalización de la trayectoria temporal se llevó a cabo con el fin de establecer si los aptámeros están siendo retenidos o no en las células o están regresando al fluido extracelular. El mejor aglutinante para el receptor de transferrina, TfR3, se incubó con células bEnd.3 a través de seis puntos temporales diferentes (0,5, 1, 2, 4, 6, 8 h). Las células fueron visualizadas con un microscopio confocal.

Patrones similares de internalización se observaron en cada punto temporal consistente con los resultados anteriores, con ambos conjuntos de experimentos que muestran una distribución uniforme y apariencia punteada. La Figura 3 muestra que este patrón de distribución se mantuvo durante las ocho horas de incubación, lo que indica que el aptámero no se eliminó de las células.

Ejemplo 2 Caracterización de aptámeros de EpCAM

El aptámero de 48 mer SYL3C (longitud completa o LC) fue generado originalmente por Song y col., (2013) Analytical Chemistry 85:4141-4149. Se prevé que las estructuras en 2D utilicen RNAfold. Las versiones truncadas de este aptámero designadas Ep7, Ep8 y Ep9, respectivamente fueron generadas como se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 4. Las secuencias de los aptámeros Ep7 y Ep7 extendido y revuelto se muestran en la Tabla 2. El Ep7 extendido tiene el mismo bucle de unión que Ep7 y el Ep7 extendido y revuelto ha seleccionado aleatoriamente pares de bases en el bucle de unión. Se prevé que las estructuras en 2D utilicen RNAfold (Gruber AR y col., (2008) The Vienna RNA websuite. Nucleic acids Research 36:W70-W4.

Todos los aptámeros incluyendo Ep7, Ep8, Ep9 truncados, ExEp7 extendido (Ex), ScrEx Ep7 revuelto (Scr) se sintetizaron comercialmente (Integrated DNA Technologies) con un colorante TYE665 en el extremo 5' y una timidina invertida en el extremo 3'.

i) Determinación de la afinidad de unión

La constante de equilibrio de disociación (K_D) de cada aptámero de EpCAM en ADN (Ep7, Ep8 y Ep9) se determinó mediante la medición de su unión a la proteína de EpCAM nativa expresada en la superficie celular utilizando citometría de flujo. HT29, HEY y HEK293T (5×10^5 células) se incubaron primero con tampón de bloqueo (PBS que contiene SFB al 10 %, 1 mg/ml de ARNt, 1 mg/ml de ASB) durante 30 minutos seguido de un único lavado con tampón de unión (PBS que contiene SFB al 10 %, 1 mg/ml de ARNt, 1 mg/ml de ASB) antes de la incubación con diluciones en serie de concentraciones de los respectivos aptámeros marcados con TYE665 (0 a 200 nM) en tampón de unión durante 30 min a 37 °C. Las células se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en PBS antes del análisis por citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia se determinó utilizando un citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson), contando 10.000 eventos en cada muestra. La intensidad media de fluorescencia de cada concentración se resta de la del control autofluorescente y la K_D para cada aptámero se calculó a partir de los valores normalizados para la intensidad fluorescente.

La Figura 5A muestra la determinación de las constantes de equilibrio de disociación (K_D) para la interacción de Ep7, Ep8 y Ep9 contra las estirpes celulares positivas para EpCAM, HT29 y HEY en comparación con el aptámero de longitud completa de Song y col., (SEQ ID NO: 16).

La Figura 5B muestra la determinación de las constantes de equilibrio de disociación (K_D) para la interacción de los aptámeros Ex Ep 7 y Scr Ex Ep7 contra la estirpe celular de cáncer de ovario positiva para EpCAM, HEY.

Los valores de K_D para cada aptámero se proporcionan en la Tabla 3 a continuación como media $\pm$ EEM (n=3):

Tabla 3 Constantes de equilibrio de disociación de aptámeros de EpCAM truncados

Tipo de aptámero	Tipo celular	Valor de K_D (nM)
Aptámero de EpCAM de longitud completa (SEQ ID NO: 16)	HT29	$8,997 \pm 1,679$
	HEY	$494,8 \pm 147,2$
Aptámero Ep7 (SEQ ID NO: 9)	HT29	$10,96 \pm 2,786$
	HEY	$248,3 \pm 82,16$
Aptámero Ep8 (SEQ ID NO: 11)	HT29	$6,186 \pm 2,238$
	HEY	$696,1 \pm 485,6$
Aptámero Ep9 (SEQ ID NO: 12)	HT29	$31,80 \pm 7,654$
	HEY	$265,8 \pm 120,7$
Aptámero Ep7 (SEQ ID NO: 13)	HEY	$63,70 \pm 14,41$
Aptámero Scr Ex Ep7 (SEQ ID NO: 14)	HEY	$521,4 \pm 271,9$

Los resultados muestran que los aptámeros truncados mantienen la especificidad y la sensibilidad hacia EpCAM.

- 5 La Figura 6A muestra la determinación de las constantes de equilibrio de disociación (K_D) para la interacción de Ep7, Ep8 y Ep9 contra las estirpes celulares negativas para EpCAM, HEK293T y K562. La Figura 6B muestra la determinación de las constantes de equilibrio de disociación (K_D) para la interacción de Ex Ep 7 extendido y Ex Ep 7 revuelto contra la estirpe celular de cáncer de ovario positiva para EpCAM, HEY.
- 10 Estos resultados muestran que los aptámeros Ep7, Ep8 y Ep9 no se unieron a las estirpes celulares negativas para EpCAM.

ii) Ensayo de internalización

- 15 La capacidad de cada aptámero de EpCAM en ADN para ser internalizado se estableció mediante microscopia confocal. HT29, HEY, K652 y HEK293T se sembraron a 8×10^5 células por pocillo en un portaobjetos con 8 cámaras durante 24 h en preparación para micromatriz confocal. Las células se incubaron con tampón de bloqueo durante 60 min, seguido de una resuspensión en tampón de unión y conteniendo 200 nM de aptámero de EpCAM o aptámero de control negativo y se incubaron durante 60 min a 37 °C. Bisbencimida Hoechst 33342 (3 mg/ml) (Sigma) se añadió a las células durante los 10 min finales de incubación. La solución de aptámeros se eliminó y las células se lavaron tres veces durante 5 min, cada una en PBS antes de su visualización utilizando un microscopio confocal de barrido por láser FluoView FV10i (Olympus).

La Figura 7 muestra los resultados de las imágenes confocales de células cultivadas HT29 y HEY teñidas con aptámeros marcados con TYE665 (Ep7, Ep8 y Ep9). Barra de escala = 10 μ m. Los resultados muestran que los aptámeros truncados fueron internalizados por células positivas para EpCAM.

La Figura 8 muestra imágenes confocales de células cultivadas HEK293T, HT29 y HEY teñidas con aptámeros marcados con TYE665 (Ex Ep 7 y Scr Ex Ep 7). Los resultados muestran que Ex Ep7 extendido se internalizó, sin embargo, el aptámero Ex Ep7 revuelto no se internalizó.

iii) Determinación de la eficiencia de la carga de doxorubicina

- La clase de fármacos antraciclina, incluyendo DOX, tienen propiedades de fluorescencia que se inactivan después de la intercalación en el ADN (Valentini L y col., (1985) Il Farmaco Edizione Scientifica 40(6):377-90. La fluorescencia natural de la doxorubicina y su posterior inactivación después de intercalarse con los aptámeros de EpCAM en ADN se utilizó para la medición de la extensión de la conjugación de doxorubicina a través de espectroscopia fluorescente. El procedimiento de conjugación se estudió utilizando diferentes relaciones molares de aptámero-doxorubicina (0, 0,01, 0,04, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, y 0,6) y se analizaron con un lector de placas de fluorescencia basado en una curva estándar de doxorubicina exenta.

Antes de la conjugación, los aptámeros se prepararon para su aplicación como se ha descrito previamente. A continuación, DOX se combinó con un aptámero en el tampón de conjugación que contenía acetato de sodio 0,1 M, NaCl 0,05 M, $MgCl_2$ 5 mM y se incubó a 37 °C en una mezcladora orbital/incubadora (RATEK) durante 1 hora con agitación (75 rpm). El conjugado se pasó por una columna media Sephadex®G-10 (Sigma-Aldrich) para separar el conjugado de aptámero:doxorubicina de DOX exenta. Como DOX tiene una fluorescencia natural que posteriormente se inactivó después de la intercalación en el ADN bicatenario, esta característica de DOX fue explotada para determinar la cantidad de DOX que se intercala en la región de tallo bicatenario de los aptámeros conjugados. Después de la separación de columna, DOX se extrajo a partir del rendimiento del conjugado mediante la adición de 150 μ l de acetonitrilo. Después, esta solución se centrifugó durante 5 min a 21.000 g. Ochenta microlitros de sobrenadante se eliminaron y la intensidad de fluorescencia se cuantificó con un lector de placas fluorescente. Una curva estándar de calibración fue preparada con concentraciones conocidas de DOX bajo la misma condición.

Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism 3 y los datos se notificaron como media y error estándar de la media (media $\pm$ EEM) a menos que se indique lo contrario.

Se determinó la relación molar de cada aptámero a la doxorubicina y se muestra en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4 Relación de aptámero a DOX

Aptámero	Relación molar aptámero:dox
Aptámero de longitud completa de EpCAM (SEQ ID NO: 16)	0,53 $\pm$ 0,13
Aptámero Ep7 (SEQ ID NO: 9)	0,42 $\pm$ 0,11

Aptámero Ep8 (SEQ ID NO: 11)	0,38 ± 0,06
Aptámero Ep9 (SEQ ID NO: 12)	0,35 ± 0,06
Aptámero ExEp7 (SEQ ID NO: 13)	1,17 ± 0,02
Aptámero ScrExEp7 (SEQ ID NO: 14)	1,01 ± 0,01

Los aptámeros de longitud completa y truncados fueron capaces de intercalar la doxorubicina.

Ejemplo 3 Caracterización de aptámeros conjugados

5

(i) Aptámeros conjugados

Un aptámero contra EpCAM había sido previamente generado por Song y col., (2013) Analytical Chemistry 85:4141-4149. Una versión truncada de este (designada Ep7, Tabla 2), que anteriormente se había caracterizado en el laboratorio del inventor, se utilizó para conjugarse con los aptámeros anti-TfR con el fin de producir tres aptámeros biespecíficos para su caracterización. Las secuencias de los aptámeros bifuncionales se muestran en la Tabla 2. Los bucles de unión de cada uno de TfR y Ep7 fueron revueltos. Bi1 se basó en TfR1 y Ep7, Bi2 se basó en TfR2 y Ep7 y Bi3 se basó en TfR3 y Ep7.

Los cambios menores se hicieron en la región de tallo para aumentar el número de pares GC, en previsión de la intercalación de los aptámeros con doxorubicina. La estructura 2D de los aptámeros biespecíficos se determinó, de nuevo, con el software de Viena con el fin de establecer si la forma de los dos aptámeros originales se conservó o no en el conjugado.

(ii) Determinación de la afinidad de unión del aptámero conjugado

Como se documentó adecuadamente en la bibliografía y como ya se había observado en este estudio con los aptámeros anti-TfR, incluso pequeños cambios en la composición de un aptámero pueden alterar las propiedades de unión. Dados los cambios más sustanciales realizados en los aptámeros originales con el fin de generar los conjugados, era crítico determinar el grado en que la afinidad de unión tanto a células que expresan TfR como EpCAM se había desviado.

Se determinaron las afinidades de unión de aptámeros Bi1, Bi2 y Bi3 semicuantitativamente mediante citometría de flujo, utilizando células bEnd.3 para evaluar la reactividad con TfR, células HEY para determinar la especificidad de EpCAM y la estirpe celular MOLT4 como control negativo. Se realizaron tres ensayos de unión independientes para estos aptámeros contra las tres estirpes celulares (bEnd.3, HEY y MOLT4).

Las curvas de unión para los aptámeros conjugados revelaron unión específica contra ambas estirpes células positivas (Figura 9A-C). De hecho, las afinidades de unión para los aptámeros conjugados eran similares a, si no más sólidas que, las de los aptámeros individuales de las que fueron diseñados (Tabla 5). Al considerar la afinidad a las células bEnd.3, Bi2 (Figura 9B; KD = 305,5 ± 152,6 nM) fue un aglutinante significativamente más firme que el único aptámero en el que se basa, TfR2 (Tabla 5; KD = 524,7 ± 161,3 nM). Además, los otros dos aptámeros conjugados muestran afinidades de unión en el intervalo del de los dos aptámeros anti-TfR que compartían los mismos bucles de unión respectivos. Contra de las células HEY que expresan EpCAM, ambos aptámeros conjugados que contenían el mismo bucle de unión como el aptámero Ep7 tenían una afinidad de unión similar a los previamente grabados (KD = 248,3 ± 82,16 nM). En cambio, Bi1, que tenía el bucle de unión a EpCAM revuelto, tenía una afinidad de unión mucho más débil (Figura 9A; KD = 921,2 ± 269,7 nM).

Tabla 5 Comparación de las afinidades de unión de los aptámeros conjugados con los aptámeros constituyentes

bEnd.3 (positiva para TfR)			
Aptámero individual	KD (nM)	Aptámero conjugado	KD (nM)
TfR1	5764 ± 7117	Bi1	1686 ± 1838
TfR2	524,7 ± 161,3	Bi2	305,0 ± 152,6
TfR3	365,5 ± 83,28	Bi3	341,7 ± 78,34
HEY (positiva para EpCAM)			
Aptámero individual	KD (nM)	Aptámero conjugado	KD (nM)
(No analizado)	-	Bi1	921,2 ± 269,7
Ep7	248,3 ± 82,16	Bi2	205,3 ± 73,34
Ep7	248,3 ± 82,16	Bi3	218,9 ± 49,23

45

No se observó unión alguna de los aptámeros conjugados contra la estirpe celular negativa MOLT4. Esto contrasta

con los resultados anteriores con los aptámeros anti-TfR contra estas células, lo que demuestra que la unión era no específica (Figura 3). Esto resulta evidente en que no se observó cambio alguno en la fluorescencia de la población entre las concentraciones de aptámero de 0 nM y 100 nM (Figura 9D-F).

5 (iii) Análisis cuantitativo de la internalización del aptámero conjugado en células

Al igual que con los aptámeros únicos anti-TfR, fue necesario asegurar que la unión que se había observado podría atribuirse a la internalización celular en lugar de a la unión superficial. Esto se hizo de una manera similar a la anterior. La internalización de los aptámeros conjugados fue visualizada en una concentración de 400 nM en células bEnd.3,
10 HEY y MOLT4 en el transcurso de una incubación de dos horas con microscopia confocal.

Como se observa por microscopia confocal, se observaron los tres aptámeros conjugados para llegar a ser internalizados en la estirpe celular HEY positiva para EpCAM. En cambio, solo los aptámeros Bi2 y Bi3 se internalizan en las células bEnd.3 que expresan TfR. Una vez más, una distribución de tinción punteada estaba presente dentro
15 de las células que habían ocupado un aptámero. No se observó internalización en el control negativo MOLT4.

(iv) Determinación de la especificidad de EpCAM de los aptámeros conjugados contra la estirpe celular HEY

Dado que se ha observado que los aptámeros conjugados se unen a dos dianas diferentes, no estaba claro si los
20 resultados obtenidos contra la estirpe celular HEY de cualquiera de los ensayos de unión o de microscopia confocal se debieron a la unión a EpCAM o fue porque cualquier TfR estaba presente en estas estirpes celulares. De hecho, la expresión de TfR es ubicua en el tejido humano, Harel E y col., (2011) PLoS ONE 6(9):e24202. Por ende, también era importante asegurarse que un aptámero anti-TfR de ratón no tuviese una reacción cruzada con las células HEY. Esto confirmaría que la unión específica (Figura 10) y la internalización vistas por los aptámeros conjugados contra la estirpe
25 celular HEY se podrían atribuir a la porción de unión a EpCAM de los aptámeros. Esto se realizó mediante dos procedimientos, con el aptámero anti-TfR de unión más firme, TfR3. Una curva de unión se generó a través de citometría de flujo y las células se visualizaron con microscopia confocal.

Los resultados del ensayo de unión de TfR3 contra la estirpe celular HEY mostraron una unión no específica clara
30 (Figura 10). En concordancia con este hallazgo, la internalización del aptámero no se detectó en estas mismas células. Estas dos líneas de evidencia proporcionan confianza en las propiedades de unión a EpCAM de los aptámeros conjugados.

Ejemplo 4 Un modelo de barrera hematoencefálica in vitro

35 (i) Caracterización del modelo de BHE in vitro

El propósito de diseñar un aptámero para el direccionamiento del TfR era para que pueda pasar a través de la monocapa endotelial de la BHE. Un procedimiento reconocido para evaluar la permeabilidad de una sustancia a través
40 de la BHE es producir un modelo *in vitro* de este sistema (Wuest DM y col., (2013) Journal of Neuroscience Methods 212(2):211-21). Como tal, las células bEnd.3 se subcultivaron y se sembraron sobre insertos de Transwell en medios libres de suero con la intención de hacer crecer una monocapa firme de células endoteliales. La integridad de esta barrera se evaluó mediante la medición de la resistencia eléctrica transendotelial (RETE) como se describe en (Wilhelm I y col., (2011) Acta Neurobiologiae Experimentalis 71(1):113-28). Los insertos de Transwells se tiñeron con
45 hematoxilina y eosina y se visualizaron a través de microscopia óptica. Las imágenes de Transwells mostraron una cobertura irregular de las células, en consonancia con la lectura de RETE menor. A pesar de esto, sin embargo, la cobertura de las células a través de la membrana era extensa.

50 (ii) Determinación de la permeabilidad del aptámero conjugado a través de un modelo de barrera hematoencefálica in vitro

La característica clave que se requiere de los aptámeros conjugados con el fin de que sean utilizados en el direccionamiento de las metástasis cerebrales es la capacidad de atravesar la BHE. La mejor manera de hacerlo en un entorno *in vitro* es determinar si estos aptámeros pueden pasar a través de un modelo de este sistema fisiológico.
55 Por lo tanto, las células HEY fueron cocultivadas en el compartimento inferior de un modelo de BHE in vitro, y después de dejarse crecer durante la noche, 2 μ M de los aptámeros conjugados se incubaron en el compartimento superior durante tres horas. Las células HEY se visualizaron posteriormente mediante microscopia confocal.

Se observaron dos de los aptámeros conjugados, Bi2 y Bi3 que se internalizarán en las células HEY (no se muestra).
60 Estos son los mismos dos aptámeros que demostraron unión específica a la estirpe celular bEnd.3. En cambio, Bi1 no se observó dentro de las células HEY después de haber sido incubadas en el otro lado de una monocapa endotelial bEnd.3. Esta es una observación interesante, dado que este aptámero se había observado previamente por

internalizarse en las células HEY, pero no en las células bEnd.3. Esto proporciona una posible indicación de que el aptámero Bi1 no pasó a través del modelo *in vitro*, apoyando así la sugerencia de que los otros dos aptámeros atravesaron la membrana a través de RMT.

5 **Ejemplo 5 Determinación de la permeabilidad del aptámero conjugado a través de la barrera hematoencefálica in vivo**

A los ratones se les inyectó el aptámero Bi1 marcado de manera fluorescente (control negativo) y el aptámero 6 que era una combinación de la porción de unión a TfR del aptámero Bi3 fijado a la porción de unión a EpCAM de Bi1 y
 10 tiene la secuencia 5' - GC GCG GTA C CG CGC TA ACG G AT TCC TTT T CC GT- 3' (SEQ ID NO: 10) con una dT invertida en el extremo 3' y un fluoróforo en el extremo 5'. Cuando se inyectaron 2 nmol de aptámero 6 en la vena de la cola de un ratón sano, una señal era distinguible en la región de la cabeza empleando 10 minutos utilizando un sistema de formación de imágenes Xenogen IVIS Lumina II como se muestra en la Figura 11A. La intensidad de la señal fluorescente del aptámero Bi1 negativo era $6,82 \times 10^9$ y $1,25 \times 10^{10}$ para el aptámero 6 de EpCAM.

15 Cuando el ratón fue sometido a la eutanasia a los 30 minutos y se obtuvieron imágenes del cerebro disecado, una señal clara podría ser vista en la periferia del cerebro, en contraste con ninguna señal observada en los ratones a los que se les inyectó el aptámero Bi1 de control negativo. Estos resultados demuestran que los aptámeros efectivamente se pueden utilizar como agentes de transcitosis en la barrera hematoencefálica. El alto nivel de expresión TfR en el
 20 hígado sugiere un papel particular para este receptor en la captura y el almacenamiento de hierro. El hígado es conocido por expresar el receptor de la transferrina.

Ejemplo 6 Captación del aptámero con transferrina/EpCAM en el cerebro

25 Para evaluar la ventaja de los aptámeros modificados con transferrina positiva sobre sus homólogos modificados con transferrina negativa para captación cerebral, la biodistribución de aptámeros con cuatro estructuras diferentes (transferrina+/EpCAM+, transferrina+/EpCAM-, transferrina-/EpCAM+, transferrina-/EpCAM-) fue estudiada a los 30 min y 60 min después de una única inyección i.v. de estos agentes a una dosificación de 40 nmol/Kg en ratones NOD/SCID.

30 Los diversos aptámeros se designaron como sigue:

TEPP: aptámero Bi3 con transferrina positiva y EpCAM positiva (SEQ ID NO: 3)

35 TENN: aptámero Bi1 con transferrina negativa y EpCAM negativa (SEQ ID NO: 1)

TEPN: aptámero con transferrina positiva y EpCAM negativa 5' GC GCG GTA C CG CGC TA ACG G AT TCC TTT T CC GT 3'

40 TENP: aptámero con transferrina negativa y EpCAM positiva 5' GC GCG TGC A CG CGC TA ACG G AG GTT GCG TCC GT 3'

En cuanto a la acumulación en el cerebro, la cantidad de transferrina+/EpCAM+ fue estadísticamente significativamente mayor que la del homólogo de transferrina-/EpCAM- (o transferrina-/EpCAM+) a los 30 min y 60 min
 45 con un nivel de cambio de 12,2 veces (o 3,1 veces) y 10,8 veces (o 2,5 veces) superior, respectivamente (Fig. 12 y Fig. 13). Además, hubo niveles estadísticamente significativamente mayores de captación de transferrina+/EpCAM- en el cerebro que los de transferrina-/EpCAM- después de 30 min de administración, mientras que no se encontraron enormes diferencias entre estos dos grupos después de 1 h tras la inyección. Estos datos concuerdan con la retención sostenida del aptámero con transferrina+/EpCAM+ sobre transferrina-/EpCAM- en el cerebro a las 1 h después de la
 50 inyección a través de la formación de imágenes a tiempo real in vivo, lo que indica que el aptámero modificado con transferrina+ podría ser retenido en el cerebro a una alta concentración in vivo durante al menos 1 h. Tomado en conjunto, el aptámero modificado con transferrina+ exhibió una acumulación y retención de perfil favorables en comparación con la del aptámero modificado con transferrina negativa en el cerebro, lo que sugiere que este aptámero podría ser desarrollado como modalidad efectiva para superar la barrera hematoencefálica, abriendo de este modo
 55 una nueva ventana para la administración de fármacos dirigida al cerebro.

LISTADO DE SECUENCIAS

< 110> Universidad de Deakin

5 < 120> Aptámeros de EpCAM

<130> 519966

<160> 15

10 <170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 34

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia consenso de ADN del conjugado de aptámero

20 <220>

<221> N

<222> (7)..(7)

<223> G o C

25 < 220>

< 221> característica_diversa

<222> (7)..(8)

<223> n es a, c, g, o t

30 <220>

<221> N

<222> (8)..(8)

<223> A o T

35 <220>

<221> N

<222> (34)..(34)

<223> timidina inversa 3'

40 < 220>

< 221> característica_diversa

<222> (34)..(34)

<223> n es a, c, g, o t

45 <400> 1

gcgcggnncc gcgctaacgg aggtgcgtc cgtn 34

<210> 2

50 <211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> secuencia de ADN de conjugado de aptámero Bi2

<220>

<221> característica_diversa

<222> (34)..(34)

60 <223> timidina inversa 3'

<400> 2

gcgcgggccc gcgctaacgg aggttgcgtc cgtn 34

<210> 3
<211> 34

5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de ADN de conjugado de aptámero Bi3

10 <220>
<221> característica_diversa
<222> (34).. (34)
<223> timidina inversa 3'

15 <400> 3
gcgcggtacc gcgctaacgg aggttgcgtc cgtn 34

<210> 4
20 <211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223>secuencia de ADN de aptámero TfR1

<220>
<221> característica_diversa
<222> (15)..(15)

30 <223> timidina inversa 3'

<400> 4
gcgtgtgcac acgcn 15

35 <210> 5
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223>secuencia de ADN de aptámero TfR2

<220>
<221> característica_diversa

45 <222> (15)..(15)
<223> timidina inversa 3'

<400> 5
gcgtgggccc acgcn 15

50 <210> 6
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223>secuencia de ADN de aptámero TfR3

<220>
60 <221> característica_diversa
<222> (15)..(15)
<223> timidina inversa 3'

<400> 6
gcgtggtacc acgcn 15

5 <210> 7
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223>secuencia de ADN de aptámero TfR4

<220>
<221> característica_diversa

15 <222> (15)..(15)
<223> timidina inversa 3'

<400> 7
gcgtggtcac acgcn 15

20 <210> 8
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> secuencia de ADN de conjugado de aptámero Bi1

<220>
30 <221> característica_diversa
<222> (34).. (34)
<223> timidina inversa 3'

<400> 8
35 gcgcgtgcac gcgctaacgg attcctttc cgtn 34

<210> 9
<211> 18
<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223>secuencia de ADN de aptámero Ep7

45 <220>
<221> característica_diversa
<222> (18)..(18)
<223> timidina inversa 3'

50 <400> 9
acagagggtg cgtctgtn 18

<210> 10
<211> 34

55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de ADN de conjugado de aptámero (aptámero 6)

60 <220>
<221> característica_diversa

<223> timidina inversa 3'

<220>
<221> característica_diversa
5 <222> (34)..(34)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 10
gcgcgggtacc gcgctaacgg attccttttc cgtn 34
10

<210> 11
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15

<220>
<223> secuencia sintética

<220>
20 <221> característica_diversa
<222> (17)..(17)
<223> timidina inversa 3'

<400> 11
25 cccacgttgt catgggn 17

<210> 12
<211> 13
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

35 <220>
<221> característica_diversa
<223> timidina inversa 3'

<220>
40 <221> característica_diversa
<222> (13)..(13)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 12
45 ggggttgcc ccn 13

<210> 13
<211> 30
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética

55 <220>
<221> característica_diversa
<222> (30)..(30)

<220>
60 <221> característica_diversa
<222> (30)..(30)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 13
 cgcgcgccgc aggttgctg cggcgcgcgn 30

5 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia sintética

<220>
 <221> característica_diversa

15 <222> (30)..(30)

<220>
 <221> característica_diversa
 <222> (30)..(30)

20 <223> n es a, c, g, o t

<400> 14
 cgcgcgccgc attcctttg cggcgcgcgn 30

25 <210> 15
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> secuencia sintética

<400> 15
 gaattccgcg tgtgcacacg ctacagtta gtatcgctac gttctttggt agtccgttcg 60

35 ggat 64

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de aptámeros bifuncionales que comprende:
 - 5 (i) la secuencia 5' -GCG CGG TAC CGC GCT AAC GGA GGT TGC GTC CGT- 3' (SEQ ID NO: 3); o
 - (ii) la secuencia de SEQ ID NO: 3 que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones en la misma, donde el conjugado de aptámero se une a EpCAM y a TfR.
- 10 2. El conjugado de aptámeros según la reivindicación 1, que se une a TfR independientemente de la unión a EpCAM.
3. El conjugado de aptámeros según la reivindicación 1 o 2 que tiene una longitud de secuencia de entre 33 y 100 bases.
- 15 4. El conjugado de aptámeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que consiste en la secuencia 5' -GCG CGG TAC CGC GCT AAC GGA GGT TGC GTC CGT- 3' (SEQ ID NO: 3).
5. El conjugado de aptámeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una o más
- 20 modificaciones que mejoran la estabilidad del aptámero *in vitro* o *in vivo*.
6. El conjugado de aptámeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un agente quimioterapéutico.
- 25 7. El conjugado de aptámeros según la reivindicación 6, donde el agente quimioterapéutico es doxorrubicina y la doxorrubicina se intercala en la(s) región(es) de tallo del conjugado de aptámeros.
8. El conjugado de aptámeros según la reivindicación 7, donde el aptámero tiene una afinidad de unión (KD) para TfR de aproximadamente 300 a 340 nM y una afinidad de unión (KD) para EpCAM de aproximadamente
- 30 210 a 220 nM.
9. El conjugado de aptámeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que se une a una célula que expresa EpCAM y/o célula madre cancerosa.
- 35 10. El conjugado de aptámeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la célula que expresa EpCAM y/o célula madre cancerosa es una célula de tumor cerebral o una metástasis de tumor cerebral de un tumor primario o cáncer que se origina fuera del cerebro.
11. Un agente anticancerígeno o agente de diagnóstico que comprende el conjugado de aptámeros según
- 40 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 acoplado a un resto o etiqueta detectable.
12. El conjugado de aptámeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o el agente anticancerígeno según la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer cerebral, tumor cerebral o metástasis cerebral de un tumor primario que se origina fuera del cerebro en un sujeto.
- 45 13. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado de aptámeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o el agente anticancerígeno según la reivindicación 11, junto con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 50 14. El conjugado de aptámeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o un agente de diagnóstico que comprende el conjugado de aptámeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 acoplado a una etiqueta detectable, para su uso en la formación de imágenes moleculares de cáncer cerebral, tumor cerebral o metástasis cerebral.
- 55 15. Un agente de administración que comprende el aptámero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 acoplado a un ARNip, ribozima o ADNzima.

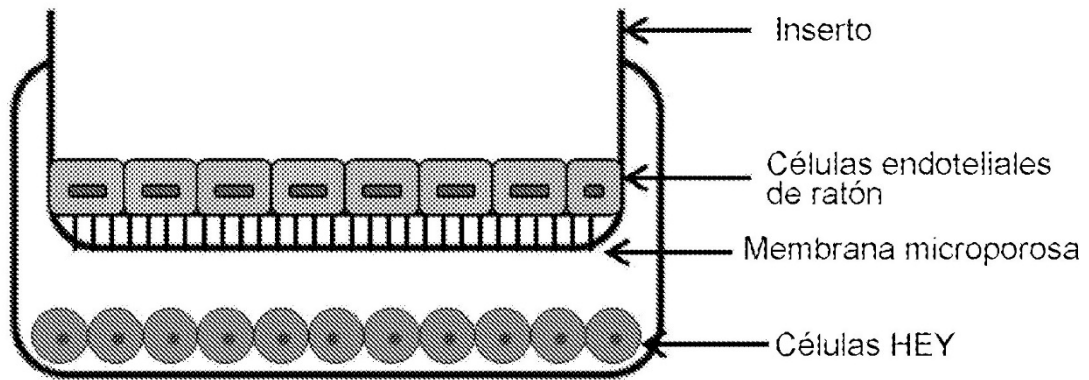


Figura 1

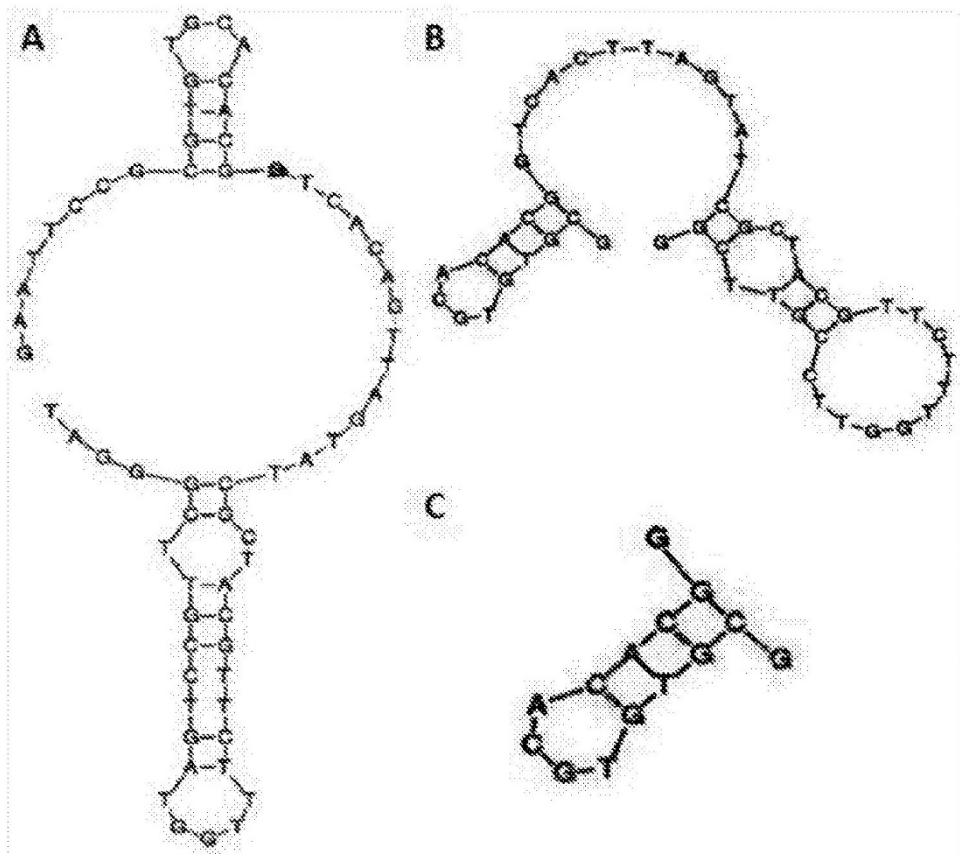


Figura 2

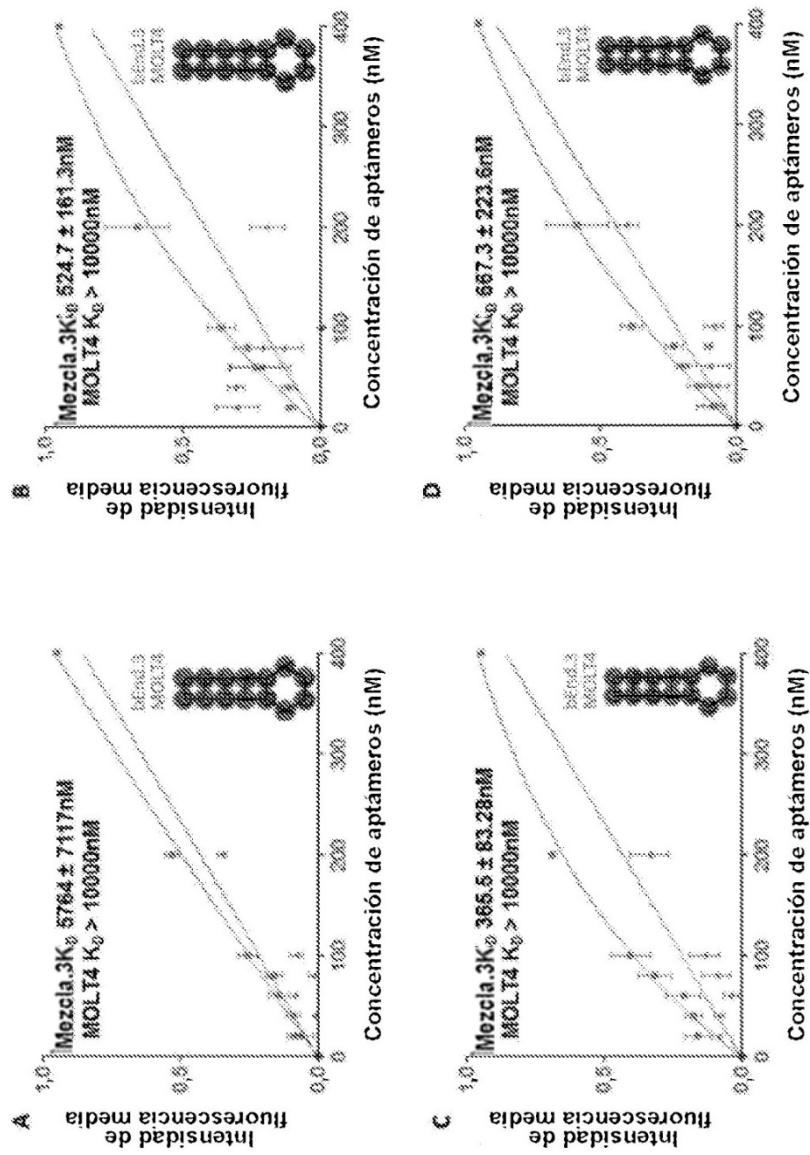
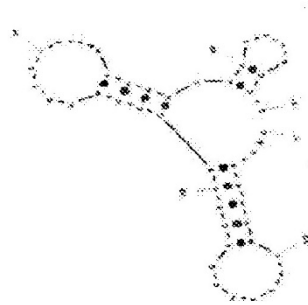


Figura 3

SYL3C / Longitud completa de Ep / Ep FL

5' CACTAC ACA GGT TGG GTC TGT CCC ACG TTG TCA TGG GGG GTT GGC CTC 3'

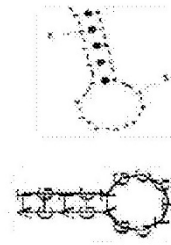
Pares de base: 48



Ep 7

5' ACA CAG GTT GCG TCT GT 3'

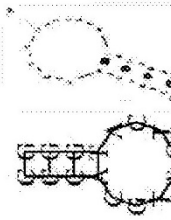
Pares de base: 17



Ep 8

5' CCC ACG TTG TCA TGG G 3'

Pares de base: 16



Ep 9

5' GGG GTT GGC CCC 3'

Pares de base: 12

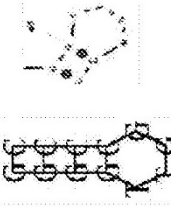


Figura 4

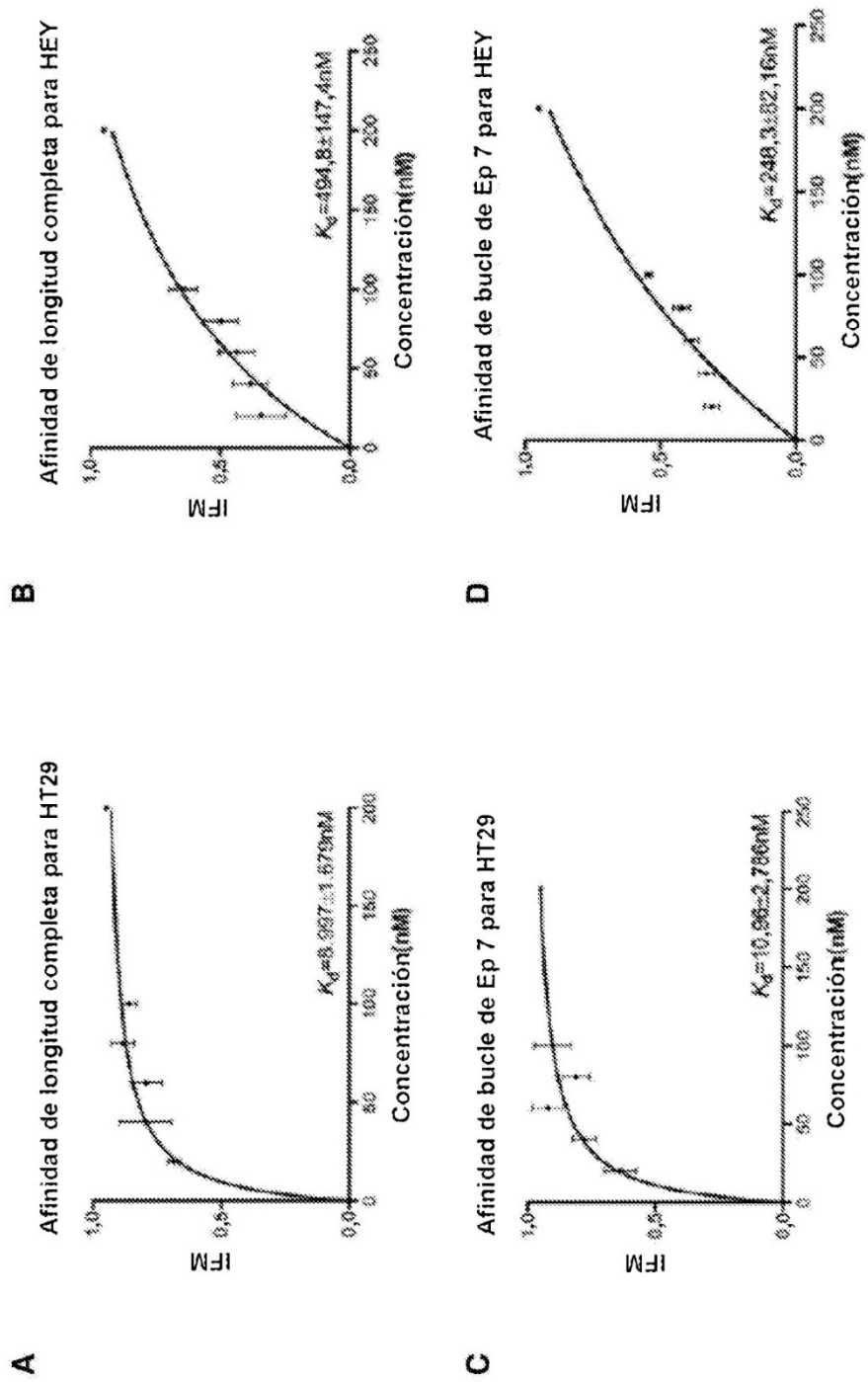


Figura 5A-1

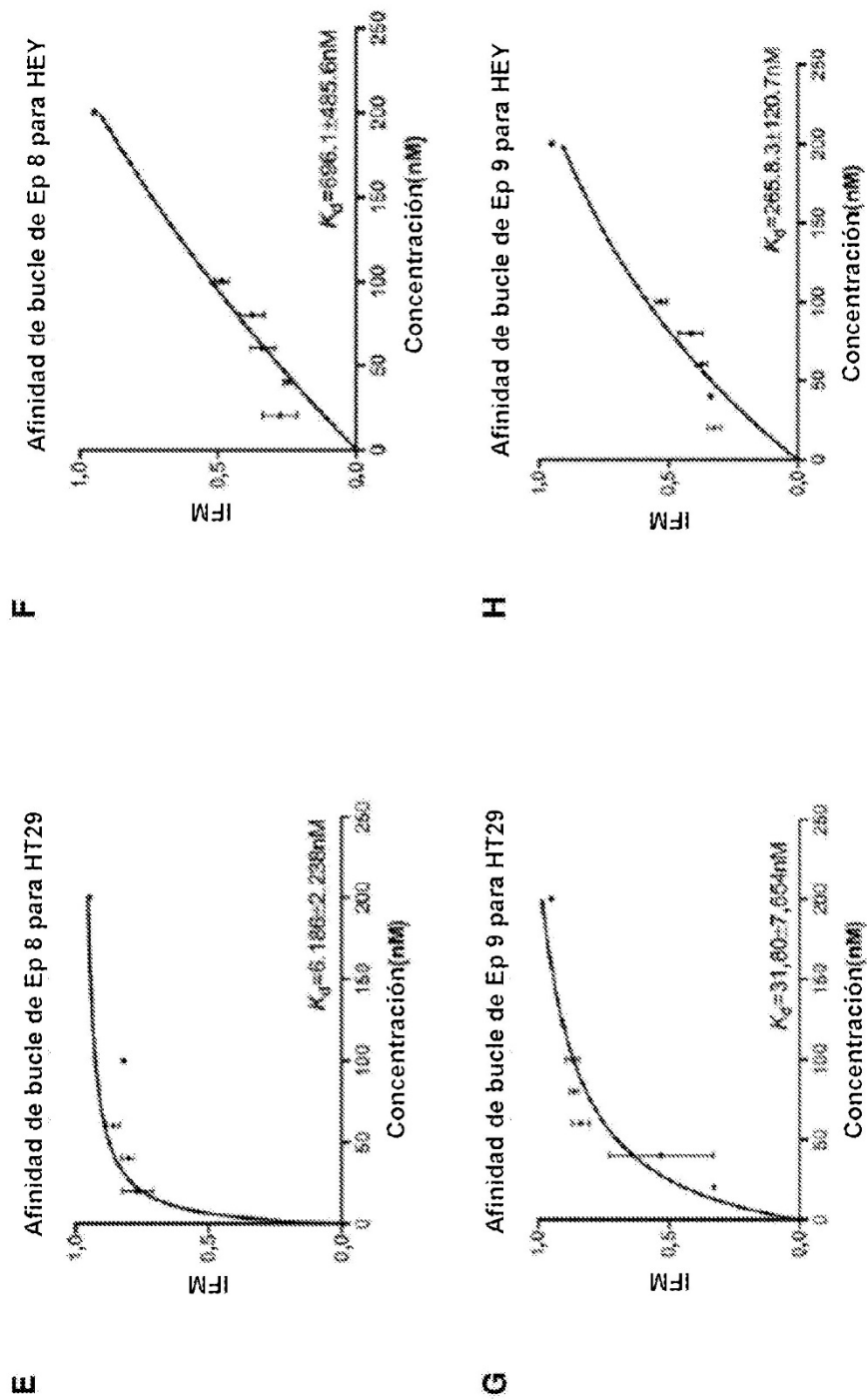


Figura 5A-2

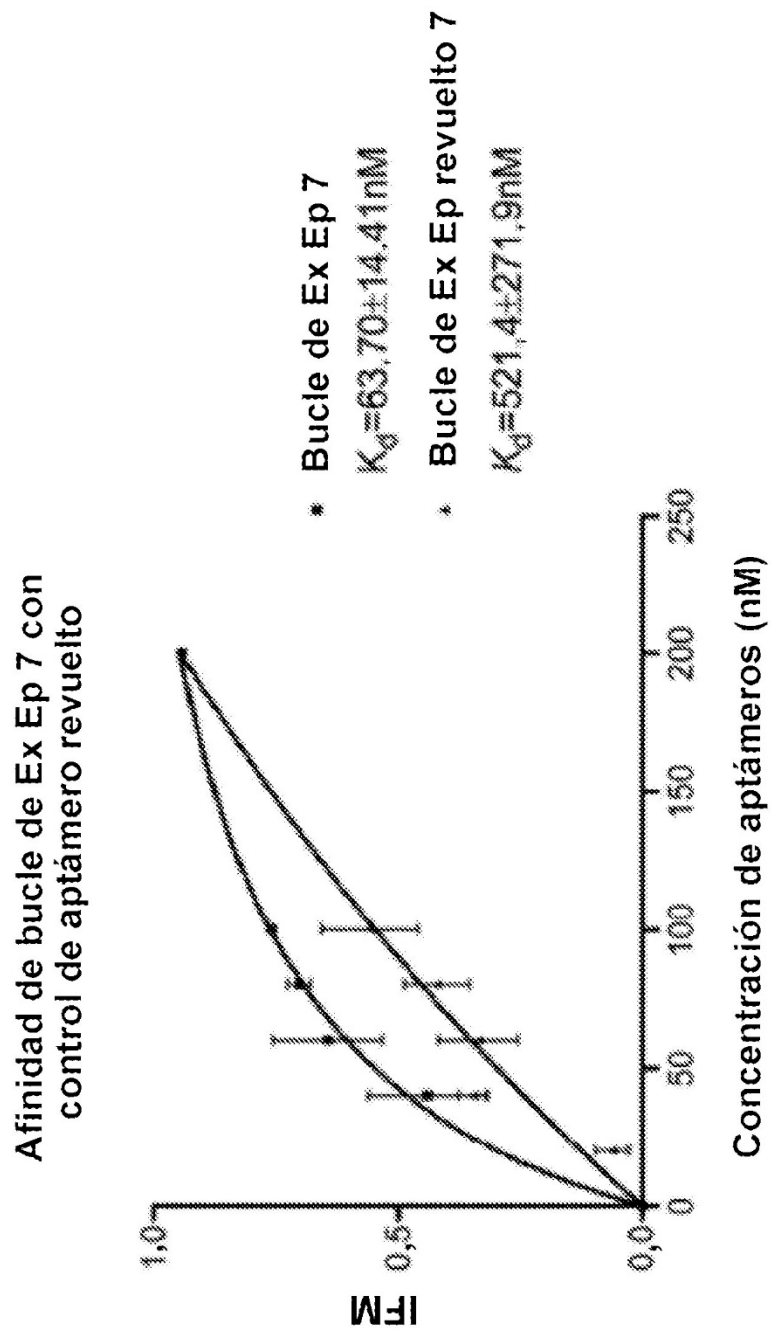


Figura 5B

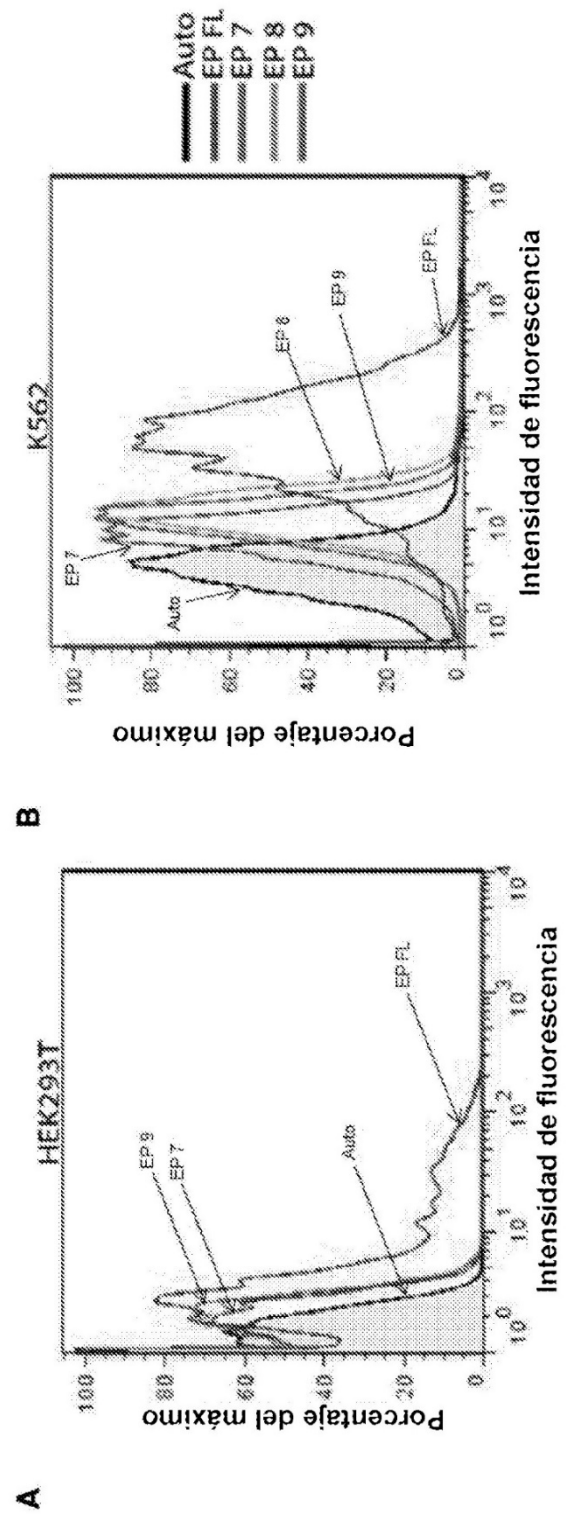


Figura 6A

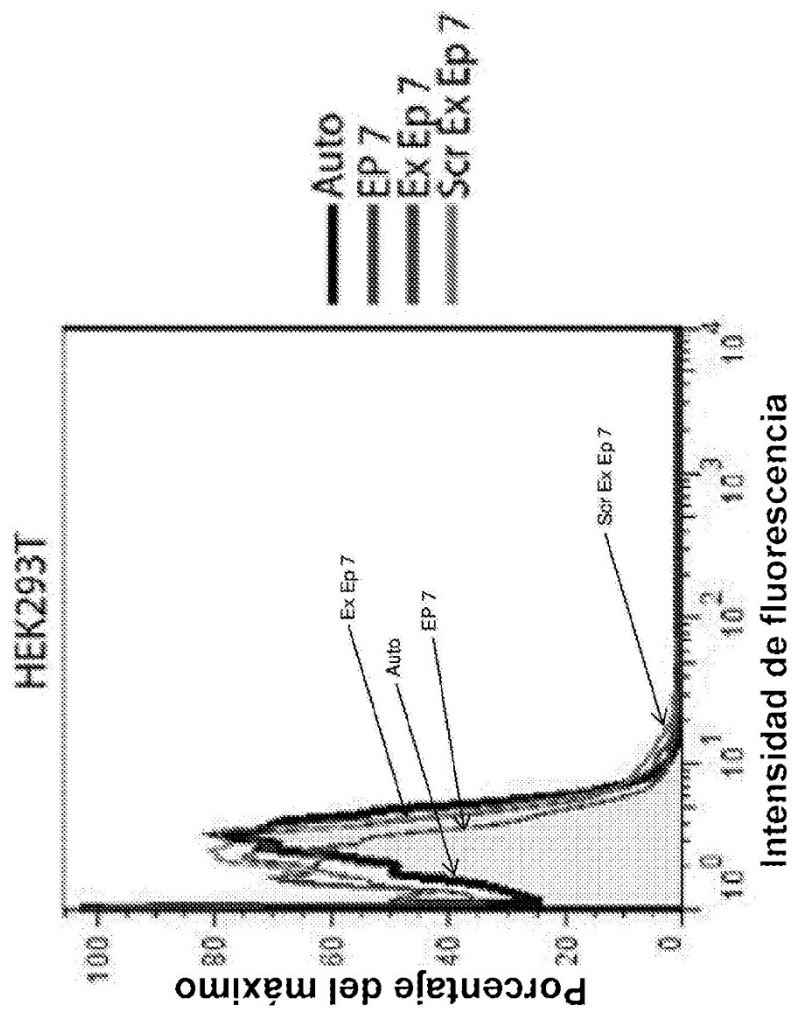


Figura 6B

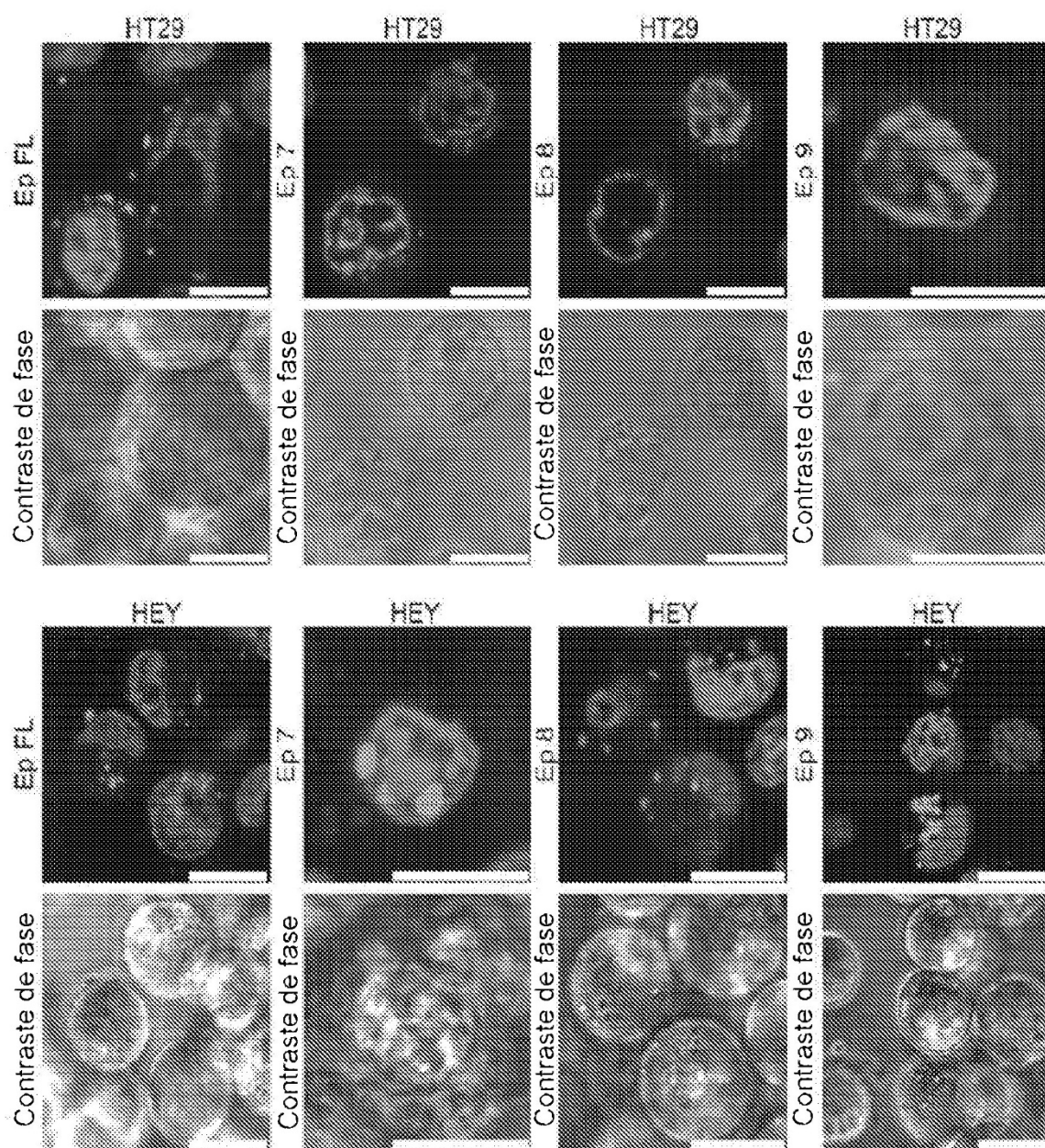


Figura 7

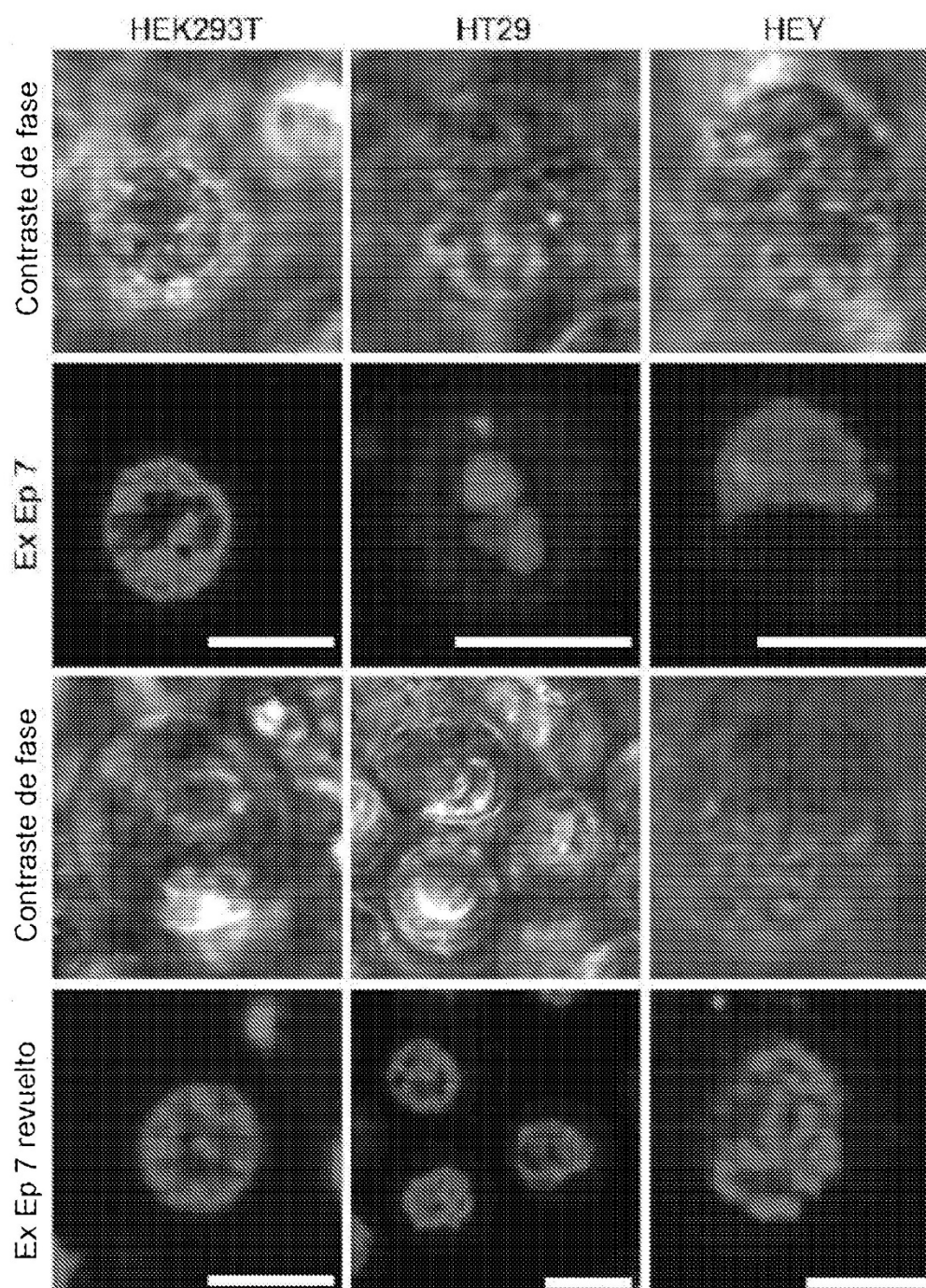


Figura 8

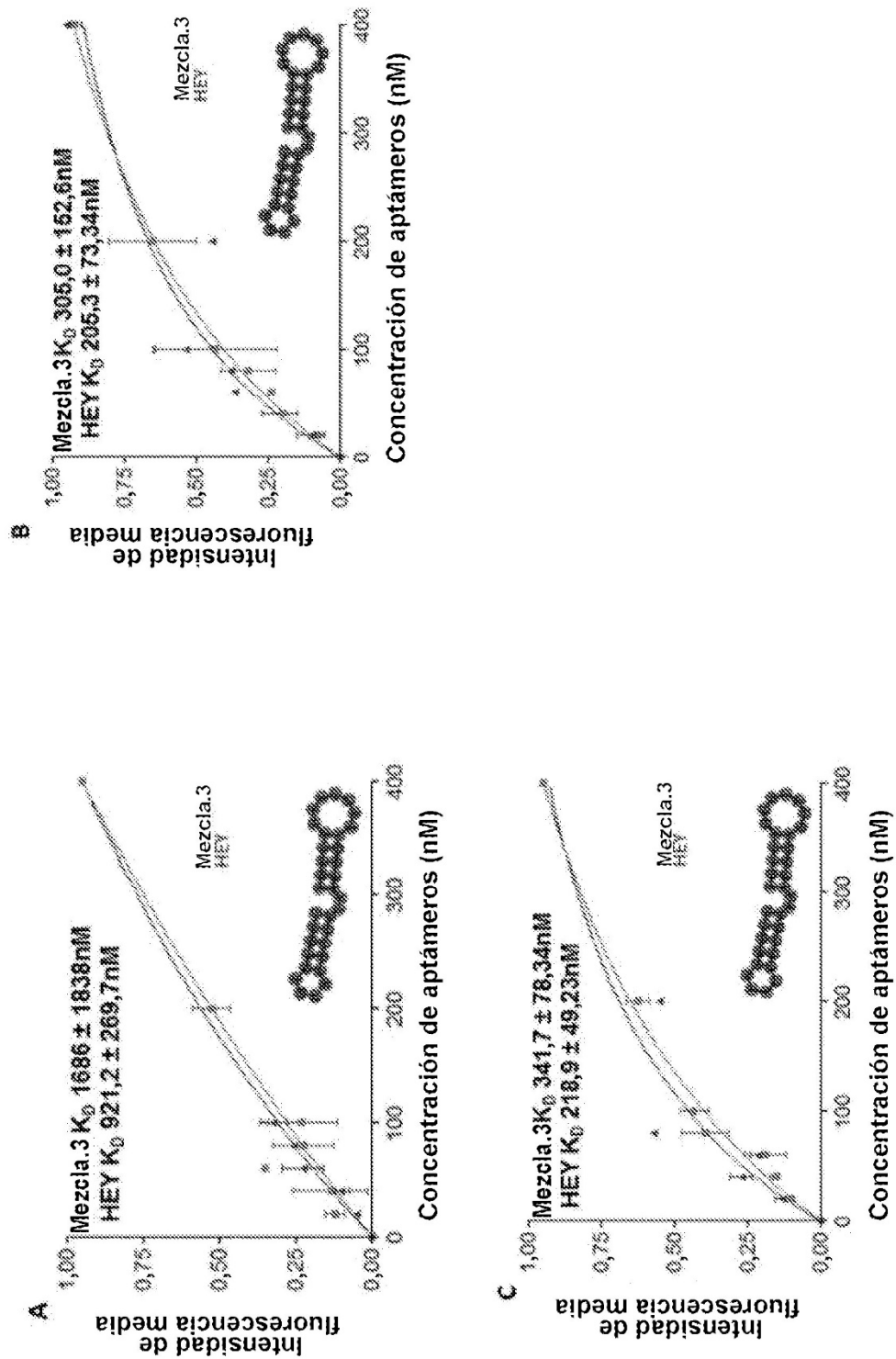


Figura 9-1

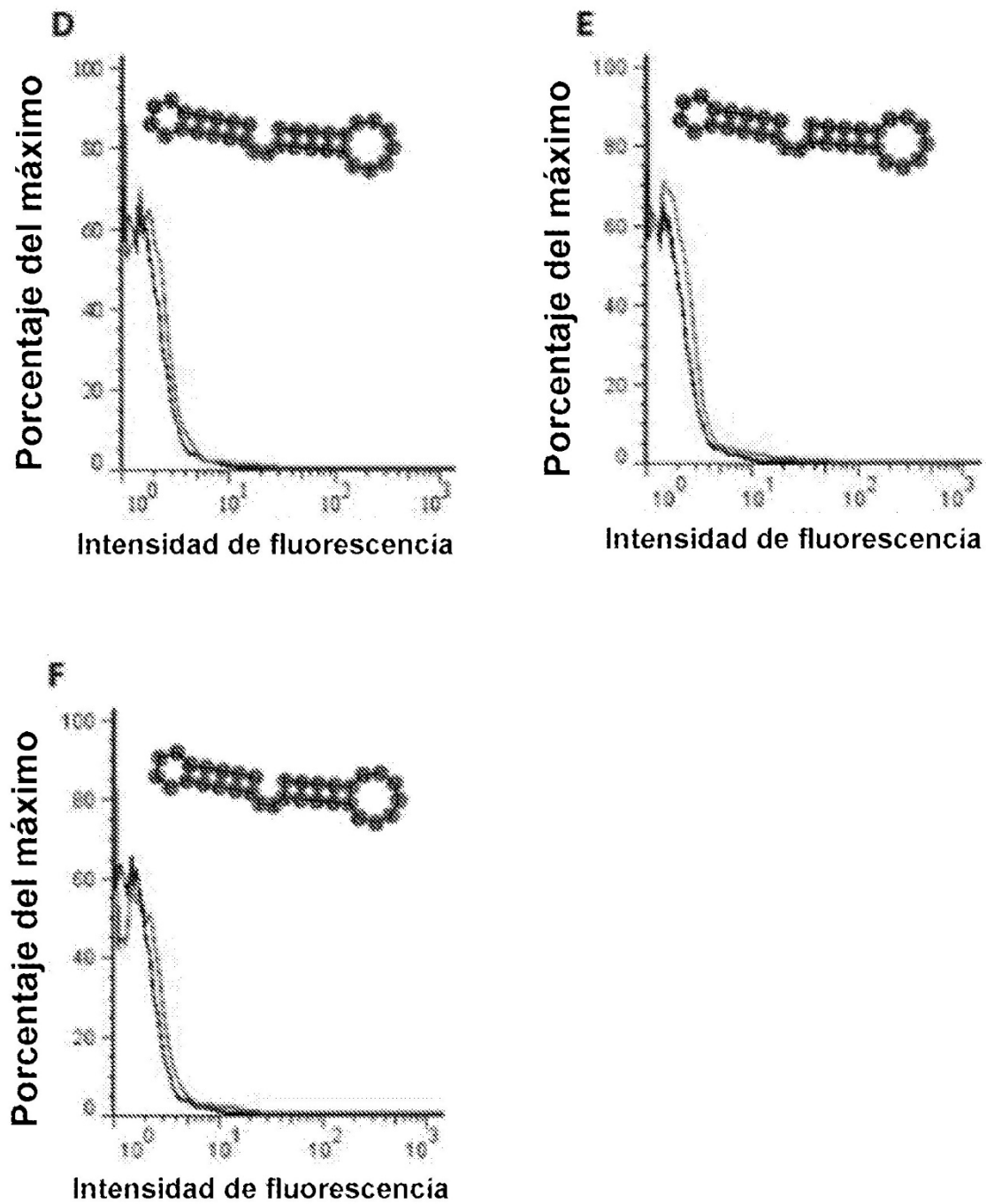


Figura 9-2

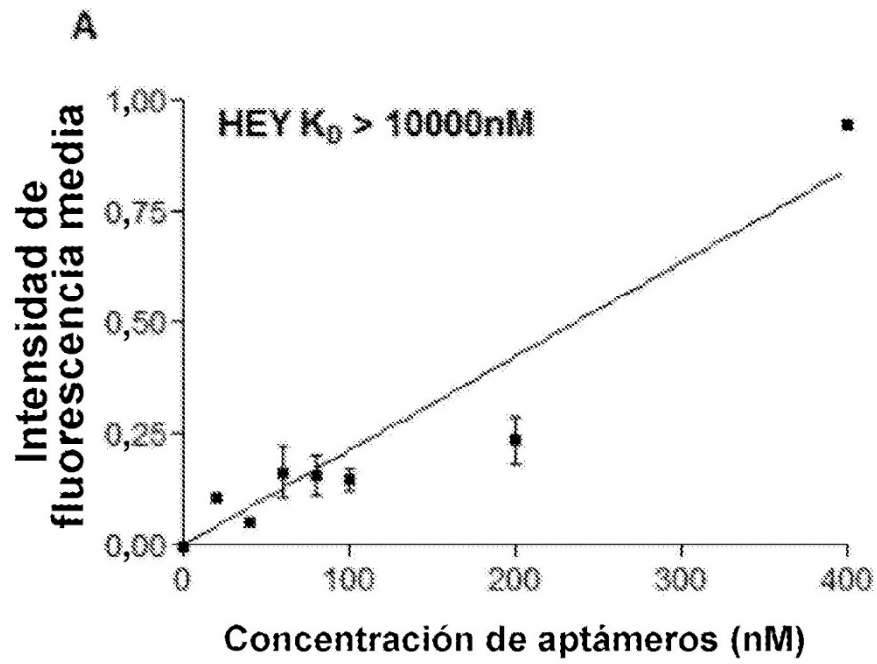


Figura 10

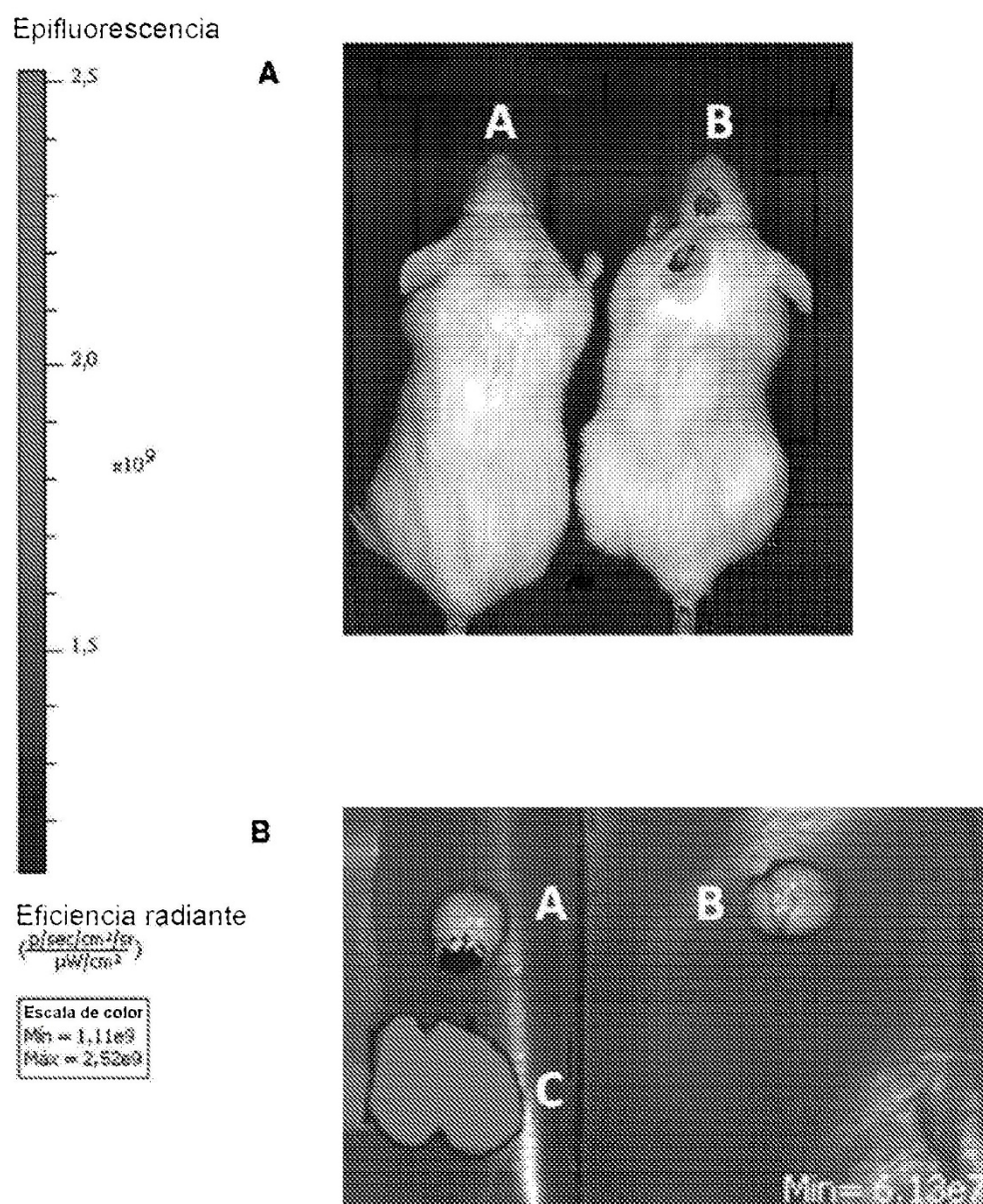


Figura 11

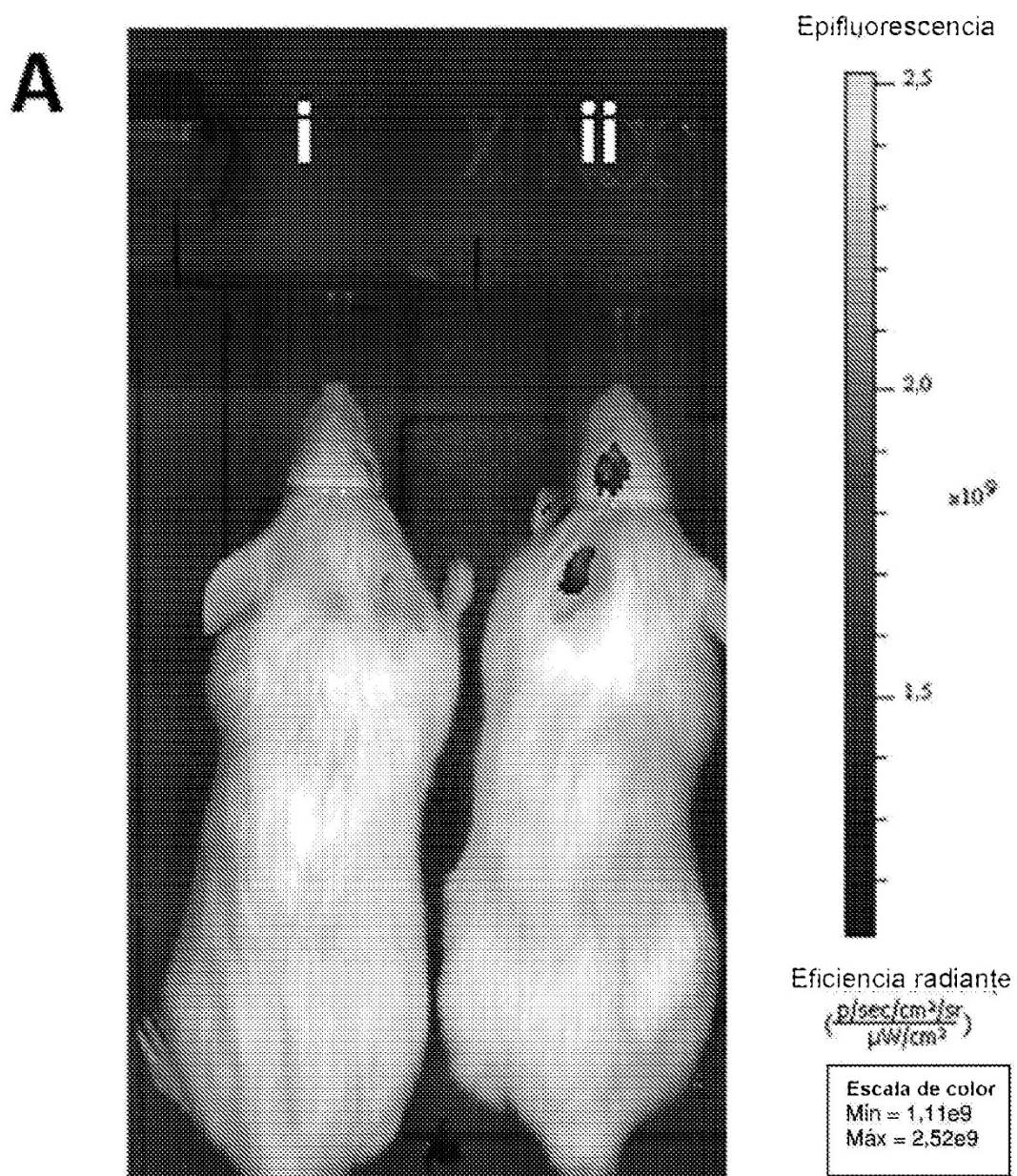


Figura 12-1

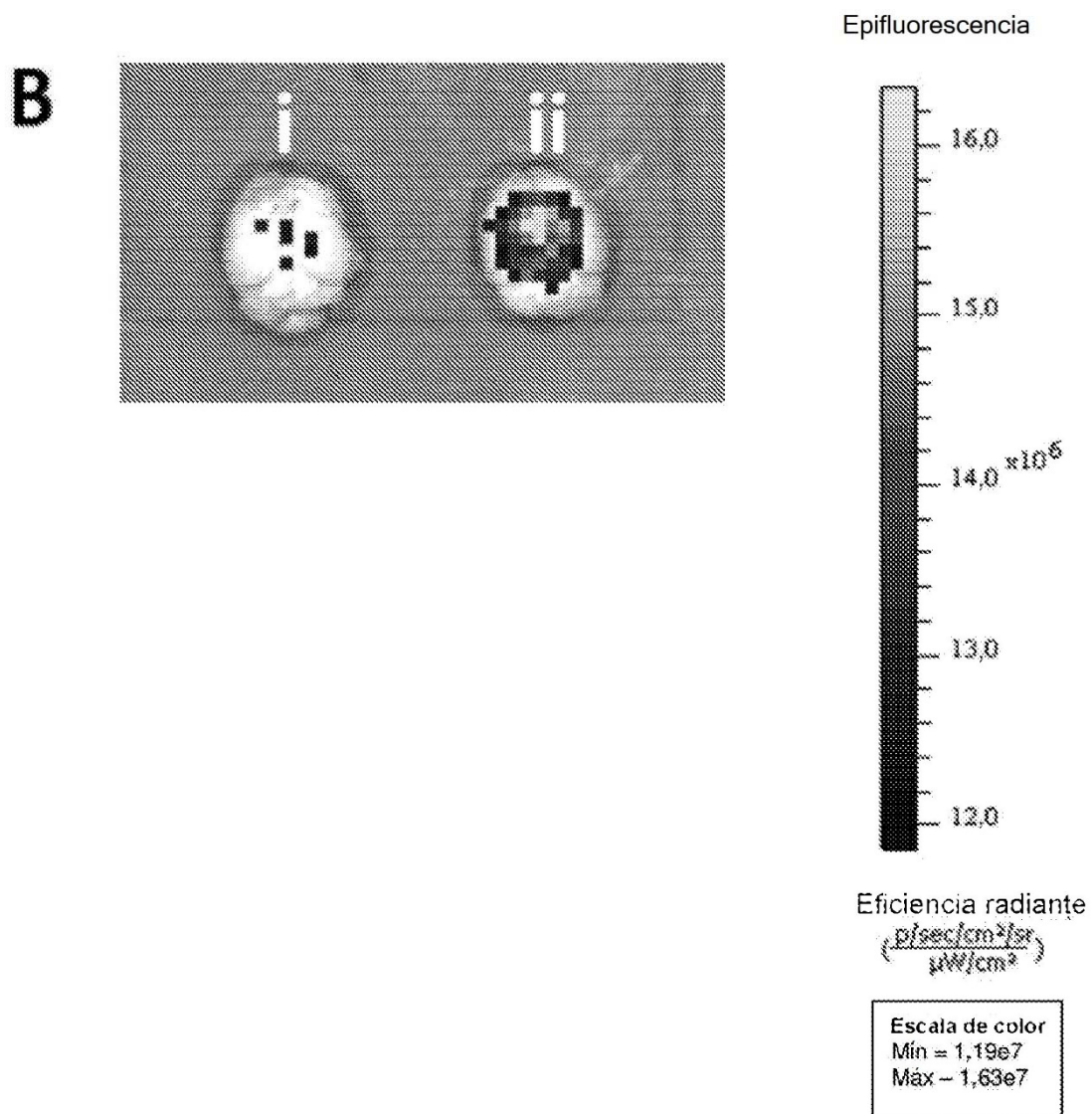


Figura 12-2

