



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 989**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00911657 .5**

96 Fecha de presentación : **28.01.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1198589**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.04.2002**

54 Título: **Ligandos de ácido nucleico de la tenascina-C.**

30 Prioridad: **29.07.1999 US 364902**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.02.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2009**

73 Titular/es: **GILEAD SCIENCES, Inc.**  
**333 Lakeside Drive**  
**Foster City, California 94404, US**

72 Inventor/es: **Hicke, Brian;**  
**Warren, Stephen;**  
**Parma, David y**  
**Gold, Larry**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

**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

Ligandos de ácido nucleico de tenascina-C.

5 **Campo de la invención**

En este documento se describen ligandos de ácido nucleico de alta afinidad por la tenascina-C. En el presente documento también se describen procedimientos para identificar y preparar ligandos de ácido nucleico de alta afinidad para tenascina-C. El procedimiento usado en la presente invención para identificar estos ligandos de ácido nucleico se denomina SELEX, un acrónimo de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment). También se describen ligandos de ácido nucleico de alta afinidad para la tenascina-C. También se describen ligandos de ARN para la tenascina-C. También se incluyen oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 2' de las purinas y pirimidinas. Además se describen ligandos de ARN para la tenascina-C que contienen modificaciones 2'-F y 2'-OME. Los oligonucleótidos de la presente invención son útiles como agentes de diagnóstico y/o terapéuticos.

**Antecedentes de la invención**

La tenascina-C es una glicoproteína hexamérica de 1,1-1,5 millones de Da que se localiza principalmente en la matriz extracelular. La tenascina-C se expresa durante la embriogénesis, la curación de heridas y la neoplasia, lo cual sugiere un papel de esta proteína en la remodelación de tejidos (Erickson y Bourdon (1989) *Ann Rev Cell Biol* 5:71-92). Los procesos neoplásicos también implican la remodelación de tejidos, y la tenascina-C está sobreexpresada en muchos tipos de tumores incluyendo carcinomas de pulmón, mama, próstata y colon, astrocitomas, glioblastomas, melanomas y sarcomas (Soini *et al.* (1993) *Am J Clin Pathol* 100(2):145-50; Koukoulis *et al.* (1991) *Hum Pathol* 22(7):636-43; Borsi *et al.* (1992) *Int J Cancer* 52(5):688-92; Koukoulis *et al.* (1993) *J Submicrosc Cytol Pathol* 25(2):285-95; Ibrahim *et al.* (1993) *Hum Pathol* 24(9):982-9; Riedl *et al.* (1998) *Dis Colon Rectum* 41(1):86-92; Tuominen y Kallioinen (1994) *J Cutan Pathol* 21(5):424-9; Natali *et al.* (1990) *Int J Cancer* 46(4):586-90; Zagzag *et al.* (1995) *Cancer Res* 55(4):907-14; Hasegawa *et al.* (1997) *Acta Neuropathol (Berl)* 93(5):431-7; Saxon *et al.* (1997) *Pediatr Pathol Lab Med* 17(2):259-66; Hasegawa *et al.* (1995) *Hum Pathol* 26(8):838-45). Además, la tenascina-C se sobreexpresa en enfermedades cutáneas hiperproliferativas, por ejemplo soriasis (Schalkwijk *et al.* (1991) *Br J Dermatol* 124(1):13-20), y en lesiones ateroscleróticas (Fukumoto *et al.* (1998) *J Atheroscler Thromb* 5(1):29-35; Wallner *et al.* (1999) *Circulation* 99(10):1284-9). Se usan anticuerpos radiomarcados que se unen a la tenascina-C para la formación de imágenes y para la terapia de tumores en situaciones clínicas (Paganelli *et al.* (1999) *Eur J Nucl Med* 26(4):348-57; Paganelli *et al.* (1994) *Eur J Nucl Med* 21(4):314-21; Bigner *et al.* (1998) *J Clin Oncol* 16(6):2202-12; Merlo *et al.* (1997) *Int J Cancer* 71(5):810-6).

Los aptámeros contra la tenascina-C tienen utilidad potencial para el diagnóstico y la terapia de cánceres, así como para el diagnóstico y la terapia de la aterosclerosis y la terapia de la soriasis. En relación con los anticuerpos, los aptámeros son pequeños (7-20 kDa), se eliminan muy rápidamente de la sangre y se sintetizan químicamente. Una rápida eliminación de la sangre es importante para la formación de imágenes de diagnóstico *in vivo*, donde los niveles sanguíneos son un determinante principal de las interferencias que oscurecen una imagen. Una rápida eliminación sanguínea también puede ser importante en terapia, donde los niveles sanguíneos pueden contribuir a la toxicidad. La tecnología SELEX permite un aislamiento rápido de aptámeros, y la síntesis química permite una conjugación fácil y con especificidad de sitio de los aptámeros con una diversidad de moléculas inertes y bioactivas. Por lo tanto, un aptámero para la tenascina-C sería útil para la terapia tumoral o la formación de imágenes de diagnóstico *in vivo* o *ex vivo* y/o para administrar una diversidad de agentes terapéuticos que han formado complejos con el ligando de ácido nucleico de tenascina-C para el tratamiento de patologías en las que se expresa la tenascina-C.

Durante muchos años el dogma ha sido que los ácidos nucleicos tenían principalmente un papel de información. Por medio de un método conocido como evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial, denominado proceso SELEX, se ha demostrado que los ácidos nucleicos tienen una diversidad estructural tridimensional similar a la de las proteínas. El proceso SELEX es un método para el desarrollo *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con una unión muy específica a moléculas diana y se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 07/536.428, presentada el 11 de junio de 1990, titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial", ahora abandonada, la patente de Estados Unidos N° 5.475.096 titulada "Ligandos de Ácido Nucleico", y la patente de Estados Unidos N° 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813) titulada "Procedimientos para Identificar Ligandos de Ácido Nucleico". Cada una de estas solicitudes, denominadas colectivamente en este documento solicitudes de patente de SELEX, describe un método fundamentalmente nuevo para preparar un ligando de ácido nucleico para cualquier molécula diana deseada. El proceso SELEX proporciona una clase de productos que se denominan ligandos de ácido nucleico o aptámeros, teniendo cada uno una secuencia única, y que tienen la propiedad de unirse específicamente a un compuesto o molécula diana deseada. Cada ligando de ácido nucleico identificado por SELEX es un ligando específico de un compuesto o molécula diana dada. El proceso SELEX se basa en la perspectiva especial de que los ácidos nucleicos tienen suficiente capacidad para formar una diversidad de estructuras bi- y tri-dimensionales y suficiente versatilidad química disponible dentro de sus monómeros como para actuar como ligandos (formar pares de unión específicos) con prácticamente cualquier compuesto químico, ya sea monomérico o polimérico. Las moléculas de cualquier tamaño o composición pueden servir como dianas en el proceso SELEX. El proceso SELEX aplicado a la aplicación de unión de alta afinidad implica la selección entre una mezcla de oligonucleótidos candidatos y repeticiones por etapas de unión, separación y amplificación, usando el mismo esquema

de selección general, para conseguir prácticamente cualquier criterio deseado de afinidad de unión y selectividad. Partiendo de una mezcla de ácidos nucleicos, preferiblemente que comprende un segmento de secuencias aleatorias, el proceso SELEX incluye las etapas de poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión, separación de ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido específicamente a moléculas diana, disociación de los complejos de ácido nucleico-diana, amplificación de los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-diana para producir una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos, y después repetición de las etapas de unión, separación, disociación y amplificación a través de tantos ciclos como se desee para producir ligandos de ácido nucleico de alta afinidad muy específicos para la molécula diana.

Los presentes inventores han reconocido que el proceso SELEX demuestra que los ácidos nucleicos como compuestos químicos pueden formar una amplia serie de formas, tamaños y configuraciones, y pueden formar un repertorio más amplio de unión y otras funciones que las presentadas por ácidos nucleicos de sistemas biológicos.

El proceso SELEX básico se ha modificado para conseguir varios objetivos específicos. Por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 07/960.093, presentada el 14 de octubre de 1992, ahora abandonada, y la patente de Estados Unidos N° 5.707.796, ambas tituladas "Procedimiento para Seleccionar Ácidos Nucleicos Basándose en la Estructura", describen el uso del proceso SELEX junto con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas tales como ADN plegado. La solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/123.935, presentada el 17 de septiembre de 1993, titulada "Fotoselección de Ligandos de Ácido Nucleico", ahora abandonada, la patente de Estados Unidos N° 5.763.177, titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: Fotoselección de Ligandos de Ácido Nucleico y SELEX en Solución" y la solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 09/093.293, presentada el 8 junio de 1998, titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: Fotoselección de Ligandos de Ácido Nucleico y SELEX en Solución", describen un procedimiento basado en SELEX para seleccionar ligandos de ácido nucleico que contienen grupos fotorreactivos capaces de unirse y/o formar fotocruzamientos con y/o fotoinactivar una molécula diana. La patente de Estados Unidos N° 5.580.737 titulada "Ligandos de Ácido Nucleico de Alta Afinidad que Discriminan Entre Teofilina y Cafeína", describe un procedimiento para identificar ligandos de ácido nucleico muy específicos capaces de discriminar entre moléculas muy relacionadas, que pueden ser no peptídicas, denominado Contra-SELEX. La patente de Estados Unidos N° 5.567.588 titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: SELEX en Solución", describe un procedimiento basado en SELEX que consigue una separación muy eficaz entre oligonucleótidos que tienen alta y baja afinidad por una molécula diana.

El proceso SELEX incluye la identificación de ligandos de ácido nucleico de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas al ligando, tales como una mejor estabilidad *in vivo* o mejores características de liberación. Ejemplos de estas modificaciones incluyen sustituciones químicas en posiciones de la ribosa y/o fosfato y/o de bases. En la patente de Estados Unidos N° 5.660.985 titulada "Ligandos de Ácido Nucleico de Alta Afinidad que Contienen Nucleótidos Modificados", que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5 y 2' de pirimidinas, se describen ligandos de ácido nucleico identificados por el proceso SELEX que contienen nucleótidos modificados. La patente de Estados Unidos N° 5.580.737, *supra*, describe ligandos de ácido nucleico muy específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino, (2'-NH<sub>2</sub>), 2'-fluoro (2'-F) y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). La solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/264.029, presentada el 22 de junio de 1994, titulada "Nuevo Procedimiento de Preparación de Nucleósidos Modificados en 2' Nuevos y Conocidos por Desplazamiento Nucleófilo Intramolecular", ahora abandonada, describe oligonucleótidos que contienen diversas pirimidinas modificadas en la posición 2'.

El proceso SELEX incluye combinar oligonucleótidos seleccionados con otros oligonucleótidos seleccionados y unidades funcionales no oligonucleotídicas como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.637.459, titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: SELEX Quimérica", y en la patente de Estados Unidos N° 5.683.867, titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: SELEX Mezclada", respectivamente. Estas solicitudes permiten la combinación de la amplia serie de formas y otras propiedades y las propiedades de replicación y amplificación eficaces de los oligonucleótidos con las propiedades deseables de otras moléculas.

El proceso SELEX además incluye la combinación de ligandos de ácido nucleico seleccionados con compuestos lipófilos o no inmunogénicos, compuestos de alto peso molecular en un complejo de diagnóstico o terapéutico como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/434.465, presentada el 4 de mayo de 1995, titulada "Complejos de Ligandos de Ácidos Nucleicos". Cada una de las patentes y solicitudes descritas anteriormente describen modificaciones del proceso SELEX básico.

## Descripción resumida de la invención

La presente invención incluye un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico para la tenascina-C y un marcador. Específicamente, el ligando de ácido nucleico para la tenascina-C puede seleccionarse del grupo que consiste en las secuencias indicadas en las SEC ID N°: 4-64. Como alternativa, dicho ligando puede tener una homología superior al 70% y tener sustancialmente la misma capacidad de unirse a la tenascina-C que uno de los ligandos con una secuencia indicada en las SEC ID N°: 4-64. También se incluye un complejo en el que el ligando tiene sustancialmente la misma estructura que se ha postulado usando RMN o por alineación de secuencias usando el programa Zukerfold y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la tenascina-C que uno de los ligandos con la secuencia indicada

en las SEC ID N°: 4-64. El complejo de la invención puede prepararse por unión covalente del ligando de ácido nucleico de tenascina-C con dicho marcador.

La invención también incluye el uso del complejo de la invención en la fabricación de una composición farmacéutica para detectar la presencia de una enfermedad en la que se expresa tenascina-C en un tejido biológico, que puede contener dicha enfermedad. En este caso, puede unirse al complejo un agente terapéutico o de diagnóstico. Además, el complejo de marcador-ácido nucleico puede usarse en la fabricación de una composición farmacéutica para administrar un agente terapéutico a una enfermedad que expresa tenascina-C, donde el agente terapéutico se une covalentemente a dicho ligando para formar dicho complejo. La enfermedad puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer, soriasis y aterosclerosis.

Además se describe un procedimiento para aislar ligandos de ácido nucleico que se unen a tenascina-C con alta especificidad. También se describen en el presente documento ligandos de ácido nucleico para la tenascina-C. En el presente documento también se describen ligandos de ARN de alta afinidad para tenascina-C. También se describen ligandos de ARN de pirimidina modificados con 2'fluoro y ligandos de ARN de purina modificados con 2'OMe para tenascina-C. El procedimiento utilizado en el presente documento para identificar estos ligandos de ácido nucleico se denomina SELEX, un acrónimo de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment). En la presente memoria se incluyen ligandos que se muestran en las Tablas 3 y 4 y en la Figura 10.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la unión de grupos de ARN SELEX de células a células U251.

La Figura 2 muestra la estructura secundaria propuesta de aptámeros TTA1 y TTA1.NB. En la figura se incluye la conjugación de los aptámeros con el quelante Tc-99m. Todas las A están modificadas con 2'OMe. Todas las G, excepto cuando se indica, están modificadas con 2'OMe. Todas las C y U están modificadas con 2'F.

La Figura 3 muestra imágenes de xenoinjertos de tumor U251 en ratones, obtenidos usando TTA1 y TTA1.NB marcados con Tc-99m, tres horas después de la inyección.

La Figura 4 muestra la microscopía de fluorescencia de una sección tumoral de glioblastoma U251, tomada tres horas después de la inyección i.v. de TTA1 marcado con Rhodamine-Red-X.

La Figura 5 muestra la forma en la que el Tc-99m y el engarce se unen a través de la 5'G de TTA1.

La Figura 6 describe la captación de TTA1/GS7641 a las 3 horas en diversos xenoinjertos de tumor humano en ratón, en comparación con la captación del aptámero de control sin unión. ID/g = dosis inyectada/gramo.

La Figura 7 presenta la biodistribución de TTA1/GS7641 marcado con In-111 usando DOTA o DTPA como quelante de radiometal, 3 horas después de la inyección. ID/g = dosis inyectada/gramo.

La Figura 8 muestra la conjugación del aptámero con DTPA. El <sup>111</sup>In se muestra como quelado por DTPA.

La Figura 9 muestra la conjugación del aptámero con DOTA. El <sup>111</sup>In se muestra como quelado por DOTA.

La Figura 10 muestra la estructura secundaria propuesta del aptámero TTA1. En la figura se incluye la conjugación del aptámero con el quelante Tc-99m. El aptámero se muestra en su forma marcada con Tc-99m. Todas las A están modificadas con 2'OMe. Todas las G, excepto cuando se indica, están modificadas con 2'OMe. Todas las C y U están modificadas con 2'F.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

El método central utilizado en la presente invención para identificar ligandos de ácido nucleico para tenascina-C se denomina proceso SELEX, un acrónimo de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) e implica (a) poner en contacto la mezcla de candidatos de ácidos nucleicos con tenascina-C, (b) repartir entre miembros de dicha mezcla de candidatos basándose en la afinidad por la tenascina-C y (c) amplificar las moléculas seleccionadas para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico con una afinidad relativamente mayor por la unión a la tenascina-C. La invención incluye ligandos de ARN para tenascina-C. Esta invención también incluye los ligandos de ARN específicos para tenascina-C mostrados en las Tablas 3 y 4 y en la Figura 10. Más específicamente, esta invención incluye secuencias de ácido nucleico que son sustancialmente homólogas y que tienen sustancialmente la misma capacidad de unirse a tenascina-C que los ligandos de ácido nucleico específicos mostrados en las Tablas 3 y 4 y en la Figura 10. Por sustancialmente homólogo se entiende un grado de homología en la secuencia primaria mayor del 70%, más preferiblemente mayor del 80%, e incluso más preferiblemente mayor del 90%, 95% ó 99%. El porcentaje de homología, como se describe en este documento, se calcula como el porcentaje de nucleótidos encontrados en la menor de las dos secuencias que se alinean con residuos nucleotídicos idénticos de la secuencia con la que se compara, pudiendo introducirse 1 hueco con una longitud de 10 nucleótidos para ayudar en la alineación. Sustancialmente la

misma capacidad de unirse a tenascina-C significa que la afinidad está dentro de uno o dos órdenes de magnitud con respecto a la afinidad de los ligandos descritos en este documento. Es bien conocido por los expertos habituales en la materia determinar si una secuencia dada - sustancialmente homóloga a las descritas específicamente en el presente documento - tiene la misma capacidad de unirse a la tenascina-C.

En las Tablas 3 y 4 se muestra una revisión de las homologías de secuencia de los ligandos de ácido nucleico de tenascina-C y la Figura 10 demuestra que secuencias con una homología primaria pequeña o nula pueden tener sustancialmente la misma capacidad de unirse a tenascina-C. Por estas razones, esta invención también incluye ligandos de ácido nucleico que tienen sustancialmente la misma estructura o motivos estructurales postulados y capacidad de unirse a tenascina-C que los ligandos de ácido nucleico mostrados en las Figuras 3 y 4 y en la Figura 10. Sustancialmente la misma estructura o motivos estructurales pueden postularse por alineación de secuencias usando el programa Zukerfold (véase Zuker (1989) Science 244:48-52). Como se conoce en la técnica, pueden usarse otros programas informáticos para predecir la estructura secundaria y los motivos estructurales. También puede postularse sustancialmente la misma estructura o motivo estructural de los ligandos de ácido nucleico en solución o como una estructura unida usando RMN u otras técnicas conocidas en este campo.

También se describe un procedimiento para detectar la presencia de una enfermedad en la que se expresa tenascina-C en un tejido biológico que puede contener la enfermedad, por el método de (a) identificar un ligando de ácido nucleico a partir de una mezcla de candidatos de ácidos nucleicos, siendo el ligando de ácido nucleico un ligando de tenascina-C, por el método que comprende (i) poner en contacto una mezcla de candidatos de ácidos nucleicos con tenascina-C, donde los ácidos nucleicos que tienen una afinidad elevada por la tenascina-C con respecto a la mezcla de candidatos pueden separarse del resto de la mezcla de candidatos; (ii) separar los ácidos nucleicos con una afinidad elevada del resto de la mezcla de candidatos; (iii) amplificar los ácidos nucleicos de afinidad elevada para producir una mezcla de ácidos nucleicos con una afinidad y especificidad relativamente mayor por la unión a la tenascina-C, con lo que se identifica un ligando de ácido nucleico de tenascina-C; (b) unir un marcador que puede usarse en diagnósticos *in vivo* o *ex vivo* al ligando de ácido nucleico identificado en la etapa (iii) para formar un complejo de marcador-ligando de ácido nucleico; (c) exponer un tejido que puede contener la enfermedad al complejo a marcador- ligando de ácido nucleico; y (d) detectar la presencia del marcador-ligando de ácido nucleico en el tejido, con lo que se identifica una enfermedad que expresa tenascina-C.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un complejo para uso en diagnósticos *in vivo* o *ex vivo* que comprende uno o más ligandos de ácido nucleico de tenascina-C y uno o más marcadores. También se incluye en esta invención un método para administrar agentes terapéuticos para el tratamiento o profilaxis de patologías en las que se expresa la tenascina-C. También se incluye en esta invención un complejo para uso en la administración de agentes terapéuticos para el tratamiento o profilaxis de patologías en las que se expresa la tenascina-C.

### Definiciones

En el presente documento se usan diversos términos para hacer referencia a aspectos de la presente invención. Para ayudar a aclarar la descripción de los componentes de esta invención, se proporcionan las siguientes definiciones:

Como se usa en el presente documento, "ligando de ácido nucleico" es un ácido nucleico no natural que tiene una acción deseable sobre una diana. Los ligandos de ácido nucleico a menudo se denominan "aptámeros". La diana de la presente invención es la tenascina-C, de aquí el término ligando de ácido nucleico de tenascina-C. Una acción deseable incluye, pero no se limita a, la unión a la diana, el cambio catalítico de la diana, la reacción con la diana de forma que modifique/altere la diana o la actividad funcional de la diana, la unión covalente a la diana como en un inhibidor suicida, favoreciendo la reacción entre la diana y otra molécula. En la realización preferida, la acción es la afinidad de unión específica por una molécula diana, siendo dicha molécula diana una estructura química tridimensional distinta de un polinucleótido que se une al ligando de ácido nucleico a través de un mecanismo que depende predominantemente de la formación de pares de bases de Watson/Crick o la unión en triple hélice, donde el ligando de ácido nucleico no es un ácido nucleico que tiene la función fisiológica conocida de unirse a la molécula diana. Los ligandos de ácido nucleico se identifican a partir de una mezcla de candidatos de ácido nucleico, siendo dicho ligando de ácido nucleico un ligando de tenascina-C, por el método que comprende: a) poner en contacto la mezcla de candidatos con tenascina-C, donde los ácidos nucleicos que tienen una afinidad elevada por la tenascina-C con respecto a la mezcla de candidatos pueden separarse del resto de la mezcla de candidatos; b) separar los ácidos nucleicos con una afinidad elevada del resto de la mezcla de candidatos; y c) amplificar los ácidos nucleicos de afinidad elevada para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en ligandos (véase la solicitud de patente de Estados Unidos N° 08/434.425, presentada el 3 de mayo de 1995, ahora patente de Estados Unidos N° 5.789.157).

Como se usa en el presente documento, "mezcla de candidatos" es una mezcla de ácidos nucleicos de diferentes secuencias a partir de la cual se selecciona un ligando deseado. La fuente de una mezcla de candidatos puede estar formada por ácidos nucleicos naturales o fragmentos de los mismos, ácidos nucleicos sintetizados químicamente, ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente o ácidos nucleicos obtenidos por una combinación de las técnicas anteriores. En una realización preferida, cada ácido nucleico tiene secuencias fijas que rodean a una región aleatoria para facilitar el proceso de amplificación.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" significa ADN, ARN, monocatenario o bicatenario, y cualquier modificación química de los mismos. Las modificaciones incluyen, pero no se limita a, las que proporcionan otros grupos químicos que incorporan una polaridad, formación de enlaces de hidrógeno, interacción electrostática, fluxionalidad y carga adicionales a las bases del ligando de ácido nucleico o al ligando de ácido nucleico en conjunto.

Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificaciones del 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-uracilo; modificaciones de esqueleto, metilaciones, combinaciones inusuales de pares de bases tales como las isobases isocitidina e isoguanidina, y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5' tales como protección terminal.

La metodología "SELEX" implica la combinación de selección de ligandos de ácido nucleico que interaccionan con una diana de una manera deseable, por ejemplo unión a una proteína, con amplificación de los ácidos nucleicos seleccionados. La ciclación repetitiva opcional de las etapas de selección/amplificación permite la selección de uno o un pequeño número de ácidos nucleicos que interaccionan muy fuertemente con la diana entre un grupo que contiene un número muy grande de ácidos nucleicos. La ciclación del procedimiento de selección/amplificación se continúa hasta que se consigue un objetivo seleccionado. En la presente invención, la metodología SELEX se emplea para obtener ligandos de ácido nucleico para tenascina-C.

La metodología SELEX se describe en las solicitudes de patente de SELEX.

"Diana de SELEX" o "diana" significa cualquier compuesto o molécula de interés para la que se desea un ligando. Una diana puede ser, sin limitación, una proteína, péptido, carbohidrato, polisacárido, glicoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, sustrato, metabolito, análogo de estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento, etc. En esta solicitud, la diana de SELEX es la tenascina-C.

"Complejo", como se usa en el presente documento, significa la entidad molecular formada por la unión covalente de uno o más ligandos de ácido nucleico de tenascina-C con uno o más marcadores. En ciertas realizaciones de la presente invención, el complejo se representa como A-B-Y, donde A es el marcador; B es opcional y comprende un engarce; e Y es un ligando de ácido nucleico de tenascina-C.

"Marcador", como se usa en el presente documento, es una entidad o entidades moleculares que cuando forman complejos con el ligando de ácido nucleico de tenascina-C, directamente o a través de uno o más engarces o espaciadores, permite la detección del complejo en una situación *in vivo* o *ex vivo* por medios químicos o visuales. Los ejemplos de marcadores incluyen, pero no se limitan a, radionúclidos, incluyendo Tc-99m, Re-188, Cu-64, Cu-67, F-18, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>32</sup>P, <sup>186</sup>Re; todos los fluoróforos, incluyendo fluoresceína, rodamina, Rojo de Texas; derivados de los fluoróforos anteriores, incluyendo Rhodamine-Red-X; compuestos magnéticos; y biotina.

Como se usa en el presente documento, "engarce" es una entidad molecular que conecta dos o más entidades moleculares a través de enlaces covalentes o interacciones no covalentes, y puede permitir la separación espacial de las entidades moleculares de manera que conserva las propiedades funcionales de una o más de las entidades moleculares. Un engarce también puede conocerse como un espaciador. Los ejemplos de engarce incluyen, pero no se limitan a, la estructura (CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> y estructuras de hexilamina mostradas en la Figura 2.

"Terapéutico", como se usa en el presente documento, incluye el tratamiento y/o profilaxis. Cuando se usa, terapéutico se refiere a seres humanos y otros animales.

"Enlace Covalente" es el enlace químico formado cuando se comparten electrones.

"Interacciones no covalentes" son medios por los cuales las entidades moleculares se mantienen juntas mediante interacciones distintas de los enlaces covalentes, incluyendo interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno.

En la realización preferida, los ligandos de ácido nucleico de la presente invención se obtienen por la metodología SELEX. El proceso SELEX se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 07/536.428, titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial" ahora abandonada, la patente de Estados Unidos N° 5.475.096, titulada "Ligandos de Ácido Nucleico" y la patente de Estados Unidos N° 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813), titulada "Procedimientos para Identificar Ligandos de Ácido Nucleico". Estas solicitudes se denominan colectivamente solicitudes de patente de SELEX.

El proceso SELEX proporciona una clase de productos que son moléculas de ácido nucleico, teniendo cada una de ellas una sola secuencia y teniendo cada una de ellas la propiedad de unirse específicamente a un compuesto o molécula diana deseado. Las moléculas diana preferiblemente son proteínas, pero también pueden incluir, entre otros, carbohidratos, peptidoglicanos y una diversidad de moléculas pequeñas. También puede usarse la metodología SELEX para dirigirse a estructuras biológicas, tales como superficies celulares o virus, por medio de la interacción específica con una molécula que es una parte integral de esa estructura biológica.

## ES 2 310 989 T3

En su forma más básica, el proceso SELEX puede definirse por la siguiente serie de etapas:

- 1) Se prepara una mezcla de candidatos de ácido nucleico de diferentes secuencias. La mezcla de candidatos generalmente incluye regiones de secuencias fijas (es decir, cada uno de los miembros de la mezcla de candidatos contiene la misma secuencia en la misma localización) y regiones de secuencias aleatorias. Las regiones de secuencia fija se seleccionan: (a) para ayudar en las etapas de amplificación descritas más adelante, (b) para imitar a una secuencia que se sabe que se une a la diana, o (c) para aumentar la concentración de una disposición estructural dada de los ácidos nucleicos en la mezcla de candidatos. Las secuencias aleatorias pueden ser totalmente aleatorias (es decir, la probabilidad de encontrar una base en cualquier posición es una de cuatro) o sólo parcialmente aleatorias (por ejemplo, la probabilidad de encontrar una base en cualquier localización puede seleccionarse a cualquier nivel entre el 0 y el 100 por ciento).
- 2) La mezcla de candidatos se pone en contacto con la diana seleccionada en condiciones favorables para la unión entre la diana y miembros de la mezcla de candidatos. En estas circunstancias, puede considerarse que la interacción entre la diana y los ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos forma pares de ácido nucleico-diana entre la diana y los ácidos nucleicos que tienen la mayor afinidad por la diana.
- 3) Los ácidos nucleicos con la mayor afinidad por la diana se separan de los ácidos nucleicos con menor afinidad por la diana. Como en la mezcla de candidatos sólo existe un número extremadamente pequeño de secuencias (y posiblemente sólo una molécula de ácido nucleico) correspondiente a los ácidos nucleicos de mayor afinidad, generalmente es deseable establecer el criterio de separación de forma que se retenga una cantidad significativa de los ácidos nucleicos en la mezcla de candidatos (aproximadamente un 5-50%) durante la separación.
- 4) A continuación se amplifican los ácidos nucleicos seleccionados durante la separación por tener la afinidad relativamente mayor por la diana para crear una nueva mezcla de candidatos que esté enriquecida en ácidos nucleicos que tienen una afinidad relativamente mayor por la diana.
- 5) Repitiendo las etapas anteriores de separación y amplificación, la mezcla de candidatos recién formada contiene cada vez menos secuencias únicas, y en general aumentará el grado medio de afinidad de los ácidos nucleicos por la diana. Llevando esto a su extremo, el proceso SELEX producirá una mezcla de candidatos que contiene uno o un pequeño número de ácidos nucleicos únicos que representan los ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos original que tienen la mayor afinidad por la molécula diana.

El proceso SELEX básico se ha modificado para conseguir varios objetivos específicos. Por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 07/960.093, presentada el 14 de octubre de 1992, ahora abandonada, y la patente de Estados Unidos N° 5.707.796, ambas tituladas "Procedimiento para Seleccionar Ácidos Nucleicos Basándose en la Estructura", describen el uso del proceso SELEX junto con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas tales como un ADN plegado. La solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/123.935, presentada el 17 de septiembre de 1993, titulada "Fotoselección de Ligandos de Ácido Nucleico", ahora abandonada, y la patente de Estados Unidos N° 5.763.177, titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: Fotoselección de Ligandos de Ácido Nucleico y SELEX en Solución" y la solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 09/093.293, presentada el 8 de junio de 1998, titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: Fotoselección de Ligandos de Ácido Nucleico y SELEX en Solución", describen un procedimiento basado en SELEX para seleccionar ligandos de ácido nucleico que contienen grupos fotorreactivos capaces de unirse y/o formar fotocruzamientos y/o fotoinactivar una molécula diana. La patente de Estados Unidos N° 5.580.737, titulada "Ligandos de Ácido Nucleico de Alta Afinidad que Discriminan entre Teofilina y Cafeína", describe un procedimiento para identificar ligandos de ácido nucleico muy específicos capaces de discriminar entre moléculas muy relacionadas, denominado Contra-SELEX. La patente de Estados Unidos N° 5.567.588, titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: SELEX en Solución" describe un procedimiento basado en SELEX que consigue una separación muy eficaz entre oligonucleótidos que tienen alta y baja afinidad por una molécula diana. La patente de Estados Unidos N° 5.496.938 titulada "Ligandos de Ácido Nucleico para HIV-RT y HIV-1 Rev", describe procedimientos para obtener ligandos de ácido nucleico mejorados después de haber realizado un proceso SELEX. La patente de Estados Unidos N° 5.705.337 titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: Químico-SELEX", describe procedimientos para unir de manera covalente un ligando a su diana.

El proceso SELEX incluye la identificación de ligandos de ácido nucleico de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas al ligando, tales como una mejor estabilidad *in vivo* o mejores características de liberación. Ejemplos de estas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de ribosa y/o fosfato y/o bases. En la patente de Estados Unidos N° 5.660.985 titulada "Ligandos de Ácido Nucleico de Alta Afinidad que Contienen Nucleótidos Modificados" que describen oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5 y 2' de pirimidinas, se describen ligandos de ácido nucleico identificados por SELEX que contienen nucleótidos modificados. La patente de Estados Unidos N° 5.637.459 *supra*, describe ligandos de ácido nucleico muy específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH<sub>2</sub>), 2'-fluoro (2'-F) y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). La solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/264.029, presentada el 22 de junio de 1994, titulada "Nuevo Procedimiento de Preparación de Nucleósidos Modificados en la posición 2' Conocidos y Nuevos por Desplazamiento Nucleófilo Intramolecular", describe oligonucleótidos que contienen diversas pirimidinas modificadas en la posición 2'.

El proceso SELEX incluye combinar oligonucleótidos seleccionados con otros oligonucleótidos seleccionados y unidades funcionales no oligonucleotídicas como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.637.459, titulada “Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: SELEX Quimérica”, y la patente de Estados Unidos Nº 5.683.867, titulada “Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: SELEX Mezclada”, respectivamente. Estas solicitudes permiten la combinación de una amplia serie de formas y otras propiedades, y las propiedades de amplificación y replicación eficaces, de oligonucleótidos con las propiedades deseables de otras moléculas.

En la patente de Estados Unidos Nº 5.496.938 se describen procedimientos para obtener ligandos de ácidos nucleicos mejorados después de haber realizado el proceso SELEX. Esta patente se titula “Ligandos de Acido Nucleico para HIV-RT y HIV-1 Rev”.

La solicitud de patente de Estados Unidos Nº 5.496.938 titulada “Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: SELEX Tisular”, presentada el 3 de mayo de 1995, ahora patente de Estados Unidos Nº 5.789.157, describe procedimientos para identificar ligandos de ácido nucleico para un componente macromolecular de un tejido, incluyendo células cancerosas, y los ligandos de ácido nucleico identificados de esta manera.

Un posible problema con el que se encuentra el uso diagnóstico o terapéutico de los ácidos nucleicos es que los oligonucleótidos en su forma fosfodiéster pueden ser degradados rápidamente en los fluidos corporales por enzimas intracelulares y extracelulares tales como endonucleasas y exonucleasas antes de que se manifieste el efecto deseado. Pueden realizarse ciertas modificaciones químicas del ligando de ácido nucleico para aumentar la estabilidad *in vivo* del ligando de ácido nucleico o para mejorar o mediar la administración del ligando de ácido nucleico. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos con el Nº de Serie 08/117.991, presentada el 8 de septiembre de 1993, ahora abandonada, y la patente de Estados Unidos Nº 5.660.985, ambas tituladas “Ligandos de Ácido Nucleico de Alta Afinidad que Contienen Nucleótidos Modificados”. Las modificaciones de los ligandos de ácido nucleico contempladas en esta invención incluyen, pero no se limitan a, las que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, polaridad, hidrofobia, formación de enlaces de hidrógeno, integración electrostática y fluxionalidad para las bases de ligando de ácido nucleico o para el ligando de ácido nucleico en su conjunto. Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, 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 uracilo; modificaciones del esqueleto, modificaciones de fosforotioato o alquil fosfato, metilaciones y combinaciones de pares de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5' tales como protección terminal. En realizaciones preferidas de la presente invención, los ligandos de ácido nucleico son moléculas de ARN que están modificadas con 2'-fluoro (2'-F) en la porción de azúcar de residuos de pirimidina.

Las modificaciones pueden ser modificaciones previas o posteriores al proceso SELEX. Las modificaciones previas al proceso SELEX producen ligandos de ácido nucleico con especificidad por su diana SELEX y con mejor estabilidad *in vivo*. Las modificaciones posteriores al proceso SELEX realizadas en ligandos de ácido nucleico 2'-OH pueden mejorar la estabilidad *in vivo* sin perjudicar a la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico.

Los expertos en la materia conocen otras modificaciones. Estas modificaciones pueden realizarse después del proceso SELEX (modificación de ligandos no modificados identificados previamente) o por incorporación en el proceso SELEX.

Los ligandos de ácido nucleico de la invención se preparan mediante la metodología SELEX que se ha indicado anteriormente y se facilita plenamente en las aplicaciones de SELEX.

Los aptámeros de tenascina-C de la invención se unen al sitio de unión de heparina del extremo COOH de la tenascina-C.

En ciertas realizaciones de la presente invención, los ligandos de ácido nucleico de tenascina-C descritos en la presente memoria son útiles para fines de diagnóstico y pueden usarse para formar imágenes de afecciones patológicas (tales como imágenes de tumores humanos). Además del diagnóstico, los ligandos de ácido nucleico de tenascina-C son útiles en el pronóstico y seguimiento de patologías en las que se expresa la tenascina-C.

Los agentes de diagnóstico sólo necesitan permitir al usuario identificar la presencia de una diana determinada en una localización o concentración particular. Simplemente la capacidad de formar pares de unión con la diana puede ser suficiente para inducir una señal positiva con fines de diagnóstico. Los expertos en la materia podrían adaptar cualquier ligando de ácido nucleico de tenascina-C mediante procedimientos conocidos en el estado de la técnica para incorporar un marcador para rastrear la presencia del ligando de ácido nucleico. Dicho marcador podría usarse en varios procedimientos de diagnóstico tales como detección de tumores primarios y metastásicos y lesiones ateroscleróticas. Los marcadores de marcaje ejemplificados en la presente memoria son tecnecio-99m y <sup>111</sup>In; sin embargo, otros marcadores tales como otros radionúclidos, compuestos magnéticos, fluoróforos, biotina y similares pueden conjugarse al ligando de ácido nucleico de tenascina-C para obtener imágenes de patologías en situaciones *in vivo* o *ex vivo* en las que se expresa la tenascina-C (por ejemplo cáncer, aterosclerosis y soriasis). El marcador puede unirse covalentemente en una diversidad de posiciones del ligando de ácido nucleico de tenascina-C, tal como a un grupo amino exocíclico de la base, la posición 5 de un nucleótido de pirimidina, la posición 8 de un nucleótido de purina, el grupo hidroxilo del fosfato o un grupo hidroxilo u otro grupo en el extremo 5' ó 3' del ligando de ácido



nucleico de tenascina-C. En realizaciones en las que el marcador es tecnecio-99m de  $^{111}\text{In}$ , preferiblemente se une al hidroxilo 5' ó 3' del grupo fosfato o a la posición 5 de una pirimidina modificada. En la realización más preferida, el marcador se une al hidroxilo 5' del grupo fosfato del ligando de ácido nucleico con o sin un engarce. En otra realización, el marcador se conjuga con el ligando de ácido nucleico incorporando una pirimidina que contiene una amina primaria en la posición 5, y usa la amina para la conjugación con el marcador. La unión del marcador puede realizarse directamente o con la utilización de un engarce. En la realización en la que se usa tecnecio-99m o  $^{111}\text{In}$  como marcador, el engarce preferido es un engarce de hexilamina como se muestra en la Figura 10.

En otras realizaciones, los ligandos de ácido nucleico de tenascina-C son útiles para la administración de compuestos terapéuticos (incluyendo, pero no limitándose a, compuestos citotóxicos, sustancias potenciadoras inmunes y radionúclidos terapéuticos) a tejidos u órganos que expresan tenascina-C. Las patologías en las que se puede expresar la tenascina-C incluyen, pero no se limitan a, cáncer, aterosclerosis y soriasis. Los expertos en la materia podrían adaptar cualquier ligando de ácido nucleico de tenascina-C mediante procedimientos conocidos en el estado de la técnica para incorporar un compuesto terapéutico en un complejo. El compuesto terapéutico puede unirse covalentemente a una diversidad de posiciones en el ligando de ácido nucleico de tenascina-C, tal como un grupo amino exocíclico en la base, la posición 5 de un nucleótido de pirimidina, la posición 8 de un nucleótido de purina, el grupo hidroxilo del fosfato o un grupo hidroxilo u otro grupo en el extremo 5' o 3' del ligando de ácido nucleico de tenascina-C. En la realización preferida, el agente terapéutico se une a la amina 5' del ligando de ácido nucleico. La unión del agente terapéutico puede realizarse directamente o con la utilización de un engarce. En realizaciones en las que la enfermedad diana es un cáncer, pueden incorporarse 5-fluorodesoxiuracilo u otros análogos de nucleótidos que se sabe que son activos contra tumores internamente en las U existentes dentro del ligando de ácido nucleico de tenascina-C o pueden añadirse internamente o conjugarse a cualquier extremo directamente o a través de un engarce. Además, pueden incorporarse tanto análogos de pirimidina 2'2'-difluoricitidina como análogos de purina (desoxicoformicina). Además, la solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/993.765, presentada el 18 de diciembre de 1997, describe, entre otros, profármacos basados en nucleótidos que comprenden ligandos de ácido nucleico dirigidos a un tumor, por ejemplo tenascina-C, para localizar de forma precisa quimiorradiosensibilizadores, y radiosensibilizadores y radionúclidos y otros agentes radioterapéuticos en el tumor.

También se contempla que tanto el marcador como el agente terapéutico puedan asociarse con el ligando de ácido nucleico de tenascina-C, de tal forma que la detección de la patología y la administración del agente terapéutico se realicen conjuntamente en un aptámero o como una mezcla de dos o más versiones modificadas diferentes del mismo aptámero. También se contempla que uno o los dos marcadores y/o el agente terapéutico puedan asociarse con un compuesto no inmunogénico de alto peso molecular o compuesto lipófilo, tal como un liposoma. En la solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/434.465, presentada el 4 de mayo de 1995, titulada "Complejos de Ligando de ácido Nucleico" se describen procedimientos para conjugar ligandos de ácido nucleico a compuestos lipófilos o compuestos no inmunogénicos en un complejo de diagnóstico o terapéutico.

Las composiciones terapéuticas o de diagnóstico descritas en la presente memoria pueden administrarse por vía parenteral mediante inyección (por ejemplo por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica e intralesional), aunque también se prevén otras formas de administración eficaces tales como inyección intraarticular, neblinas inhalantes, formulaciones activas por vía oral, iontoforesis transdérmica o supositorios. También pueden aplicarse localmente por inyección directa, o pueden liberarse desde dispositivos tales como catéteres o stents implantados, o administrarse directamente en el sitio por medio de una bomba de infusión. Un vehículo preferido es solución fisiológica salina, pero se contempla que también puedan usarse otros vehículos farmacéuticamente aceptables. En una realización, se prevé que el vehículo y el ligando de ácido nucleico de tenascina-C complejoado con un compuesto terapéutico constituya una formulación de liberación lenta fisiológicamente compatible. El disolvente primario en dicho vehículo puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Además, el vehículo puede contener otros excipientes farmacológicamente aceptables para modificar o mantener el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o el olor de la formulación. De manera similar, el vehículo puede contener otros excipientes farmacológicamente aceptables para modificar o mantener la estabilidad, la velocidad de disolución, liberación o absorción del ligando de ácido nucleico de tenascina-C. Estos excipientes son las sustancias empleadas normalmente y habitualmente para formular dosificaciones para administración parenteral en forma de dosificación unitaria o multidosis.

Una vez se ha formulado la composición terapéutica o de diagnóstico, puede almacenarse en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o polvo deshidratado o liofilizado. Estas formulaciones pueden almacenarse en una forma fácil de usar o que requiera la reconstitución inmediatamente antes de la administración. La manera de administrar formulaciones que contienen ligandos de ácido nucleico de tenascina-C para la administración sistémica puede ser por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intranasal o mediante un supositorio vaginal o rectal.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para explicar e ilustrar la presente invención y no deben considerarse limitantes de la invención. El Ejemplo 1 describe los materiales y procedimientos experimentales usados en el Ejemplo 2 para la generación de ligandos de ARN para tenascina-C. El Ejemplo 2 describe los ligandos de ARN para tenascina-C y la estructura secundaria prevista de un ligando de ácido nucleico seleccionado. El Ejemplo 3 describe la determinación del tamaño mínimo necesario para la unión de alta afinidad de un ligando de ácido nucleico seleccionado, y la sustitución de purinas con 2'-OH por purinas con 2'-OMe. El Ejemplo 4 describe la biodistribución de ligandos de ácido nucleico de tenascina-C marcados con Tc-99m en ratones que llevan tumores. El Ejemplo 5 describe el uso

de un ligando de ácido nucleico de tenascina-C marcado con fluorescencia para localizar la tenascina-C dentro del tejido tumoral. El Ejemplo 6 describe la detección de tumores *in vivo* por el Aptámero TTA1 (también conocido como GS7641). El Ejemplo 7 describe el marcaje alternativo usando <sup>111</sup>In.

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1

*Uso de SELEX para obtener ligandos de ácido nucleico para tenascina-C y para células de glioblastoma U251*

#### 10 Materiales y Métodos

La tenascina-C se adquirió en Chemicon (Temecula, CA). Los cebadores de ADN monocatenarios y las plantillas fueron sintetizadas por Operon Technologies Inc. (Alameda, CA).

El proceso SELEX se ha descrito con detalle en las solicitudes de patente de SELEX. En resumen, se prepararon plantillas de transcripción bicatenarias por extensión del fragmento Klenow de ADNss 40N7a:

5'-TCGCGCGAGTCGTCTG [40N] CCGCATCGTCCTCCC 3' (SEC ID N°: 1)

usando el cebador 5N7:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-3' (SEC ID N°: 2)

que contiene el promotor de polimerasa de T7 (subrayado). Se preparó el ARN con ARN polimerasa de T7 como ha sido descrito previamente en Fitzwater y Polisky (1996) Methods Enzymol. 267: 275-301, incorporado en la presente memoria como referencia en su totalidad. Todas las reacciones de transcripción se realizaron en presencia de nucleótidos de pirimidina que se modificaron con 2'-fluoro (2'-F) en la porción de azúcar. Esta sustitución confiere mayor resistencia a ribonucleasas que utilizan la porción 2'-hidroxilo para la escisión del enlace fosfodiéster. Específicamente, cada mezcla de transcripción contenía 2'-F UTP 3,3 mM y 2'-F CTP 3,3 mM junto con GTP 1 mM y ATP. La biblioteca de ARN aleatorizada inicial producida de esta manera comprendía 3x10<sup>14</sup> moléculas. Las afinidades de ligandos individuales por la tenascina-C fueron determinados mediante procedimientos convencionales usando separación en filtros de celulosa (Tuerk y Gold (1990) Science 249(4968):505-10).

Para cada ronda de SELEX se recubrieron placas Lumino (LabSystems, Needham Heights, MA) durante 2 horas a temperatura ambiente con 200 µl de concentraciones de tenascina-C que contenían PBS de Dulbecco como se muestra en la Tabla 1. Después del recubrimiento, los pocillos se bloquearon usando HBSMC+ tampón [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 137 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y 1 g/l de albúmina de suero humano (Sigma, fracción V) para las rondas 1 a 6, mientras que para las rondas 7 y 8 los pocillos se bloquearon con HBSMC+ tampón que contenía 1 g/l de caseína (I-block; Tropic). El tampón de unión y de lavado consistía en HBSMC+ tampón que contenía Tween 20 al 0,05%. Para cada ronda de SELEX, el ARN se diluyó en 100 µl de tampón de unión y se dejó incubar durante 2 horas a 37°C en los pocillos recubiertos con proteína que se prelavaron con tampón de unión. Después de la unión, se realizaron seis lavados de 200 µl cada uno. Después de la etapa de lavado, el pocillo seco se puso en la parte superior de un bloque calefactor a 95°C durante 5 minutos. Se realizaron reacciones de transcriptasa inversa AMV convencionales (50 µl) a 48°C directamente en el pocillo y los productos de reacción se utilizaron para reacciones de transcripción y de PCR convencionales. Para estas etapas de amplificación y de transcripción inversa se usaron dos cebadores sintéticos: 5N7 (véase anteriormente) y 3N7a:

5'-TCGCGCGAGTCGTCTG-3' (SEC ID N°: 3)

Para el proceso SELEX de células, se cultivaron células de glioblastoma humano U251 (Hum. Hered. (1971) 21:238) hasta la confluencia en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10% (GIBCO BRL Gaithersburg, MD) en placas de cultivo de tejidos de seis pocillos (Becton Dickinson Labware. Lincoln Park, NJ) y se lavaron tres veces usando PBS de Dulbecco suplementado con tampón de CaCl<sub>2</sub> (DPBS, GIBCO BRL). Se incubó ARN marcado internamente por transcripción (Fitzwater (1996), anteriormente) con las células a 37°C durante una hora. El ARN marcado después se retiró y las células se lavaron seis veces durante 10 minutos cada vez a 37°C con DPBS. Después se añadió DPBS que contenía EDTA 5 mM y se incubó con las células durante 30 minutos para eluir los ARN unidos que quedaban después de las etapas de lavado. Este ARN se cuantificó mediante un protocolo de recuento de centelleo de líquidos convencional y se amplificó usando RT-PCR.

*Ensayos de unión para las células U251.* Se incubó ARN marcado internamente a concentraciones crecientes con células U251 confluentes en placas de cultivo de tejidos de seis pocillos (Becton Dickinson Labware. Lincoln Park, NJ) a 37°C durante 60 min. El ARN no unido se retiró por medio de lavado usando tres lavados de 10 minutos con DPBS+ CaCl<sub>2</sub> a 37°C, y el ARN unido se recogió rompiendo las células usando Trizol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). El ARN unido se cuantificó por recuento de centelleo de líquidos.

*Clonación y secuenciación.* Se purificaron grupos de oligonucleótidos enriquecidos por afinidad amplificados en un gel de poliácridamida al 8%, se sometieron a transcripción inversa para dar ADNss y el ADN se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que contenían sitios de restricción de endonucleasas BamHI y HindIII. Los fragmentos de PCR se clonaron, se prepararon los plásmidos y el análisis de las secuencias se realizó de acuerdo con técnicas convencionales (Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. 3 vols., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor).

## Ejemplo 2

### 10 *Ligandos de ARN para tenascina-C*

Se obtuvieron ligandos de ácido nucleico para células U251 por el proceso SELEX y como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/434.425, titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: SELEX Tisular" presentada el 3 de mayo de 1995, ahora patente de Estados Unidos N° 5.789.157. Posteriormente se determinó que lo ligandos que se obtuvieron eran ligandos de ácido nucleico de tenascina-C.

Para obtener ligandos de oligonucleótidos contra la tenascina-C humana, se realizaron ocho rondas de SELEX usando la biblioteca de nucleótidos aleatoria descrita anteriormente en Materiales y Métodos. En la Tabla 1 se muestra la entrada de ARN y proteína en cada ronda. Después de 8 rondas de SELEX, la afinidad del grupo de oligonucleótidos para la tenascina-C era de 10 nM y esta afinidad no aumentaba con más rondas de SELEX.

Para obtener ligandos para células de glioblastoma U251, se realizaron nueve rondas de SELEX usando la biblioteca de nucleótidos aleatoria. Después de nuevas rondas de unión a células U251 y elución con EDTA, las rondas 3, 5 y 9 se ensayaron con respecto a su capacidad de unirse a células U251. La Figura 1 muestra que según aumenta el número de rondas de SELEX, también aumenta la cantidad de ARN unido a una concentración particular. Debido a la complejidad del tejido diana, no fue posible estimar la afinidad de los grupos de oligonucleótidos por la molécula o moléculas diana desconocidas en estas células.

El grupo E9 (nuevas rondas de unión y elución con EDTA a partir de las células U251) después se usó como punto de partida para un SELEX contra tenascina-C purificada. Se realizaron dos rondas de SELEX usando tenascina-C purificada como se ha descrito anteriormente. En la Tabla 2 se describen las concentraciones de entrada de proteína y de ARN para dos rondas de SELEX (E9P1 y EP92).

En resumen, se realizaron tres experimentos SELEX diferentes: un experimento usando tenascina-C purificada como diana, un experimento usando células de glioblastoma U251 como diana, y un experimento en el que se usó el grupo SELEX procedente de células de glioblastoma U251 para iniciar un experimento SELEX usando tenascina-C purificada como diana.

Los tres experimentos SELEX se analizaron por clonación y secuenciación de ligandos de la ronda 8 del SELEX de tenascina-C purificada (secuencias "TN"), de la ronda 9 del SELEX de células U251 (secuencias "E9") y de la ronda 2 del SELEX híbrido de U251/tenascina-C (secuencias "E9P2"). En la Tabla 3 se muestran las secuencias de 34 clones únicos, y se dividen en dos grupos principales: ligandos de tenascina-C (secuencias "TN" y "E9P2") y ligandos de células U251 (ligandos "E9"). Entre los ligandos de tenascina-C, la mayoría de los clones (65 en total) representan una de dos clases de secuencias distintas denominadas Familia I y Familia II (Figura 1). El examen de la región variable de los 12 clones de la Familia I reveló 7 secuencias únicas que están relacionadas a través de la secuencia consenso GACNYUCCNGCYAC (SEC ID N°: 12). El examen de la región variable de los 18 clones de la Familia II reveló secuencias que comparten una secuencia consenso CGUCGCC (Tabla 3). Las secuencias E9 podrían agruparse en una serie relacionada gracias a las secuencias GAY y CAU conservadas dentro de las regiones variables. Las demás secuencias no parecían relacionadas con otras secuencias y se clasificaron como huérfanas. Predominan tres secuencias, estando E9P2-1, E9P2-2 y TN9 representadas 14, 16 y 10 veces respectivamente. En la categoría "huérfana", una secuencia, TN18, se representó dos veces. En general, estos datos representan un grupo de secuencias muy enriquecido.

La mayoría de los individuos presentaron bajas constantes de disociación nanomolares, teniendo las tres secuencias más prevalentes, TN9 y E9P2-1 y -2, las mayores afinidades a 5 nM, 2 nM y 8 nM (Tabla 3). Estos resultados indican que el SELEX de células U251 es un depósito de aptámeros contra tenascina-C y que sólo se necesitaban dos rondas de SELEX para aislar los ligandos específicos de tenascina a partir del grupo SELEX de células. De forma similar, pueden aislarse ligandos de oligonucleótidos contra otras proteínas a partir del grupo E9 usando dianas proteicas purificadas.

## Ejemplo 3

### *Determinación del tamaño mínimo de TN9, y sustitución de purinas con 2'-OH por purinas con 2'-OMe: síntesis del aptámero TTA1*

Los procedimientos de síntesis de oligonucleótidos fueron los convencionales para los expertos en la materia (Green *et al.* (1995) Chem Biol 2(10):683-95). Los monómeros de 2'-fluoro pirimidina fosforamida se obtuvieron en JBL Scientific (San Luis Obispo, CA); los monómeros de purina con 2'-OMe, 2'-OH purina, hexilamina y

(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>, junto con el soporte sólido de dT poliestireno, se obtuvieron en Glen Research (Sterling, VA). Las afinidades de los aptámeros se determinaron usando separación en filtros de nitrocelulosa (Green *et al.*, *supra*).

Se eligió TN9 para el análisis adicional basándose en su alta afinidad por la tenascina-C. Primero se buscó una secuencia mínima necesaria para la unión de alta afinidad. Usando técnicas convencionales (Green, *et al.*, *supra*), se descubrió que los nucleótidos 3' del nucleótido 55 eran necesarios para la unión a la tenascina-C, mientras que no podía retirarse ningún nucleótido del extremo 5' sin perder afinidad. Para reducir adicionalmente la longitud de los TN9 de los 55 nucleótidos y retener la unión de alta afinidad, se intentaron definir delecciones internas de TN9. Los primeros 55 nucleótidos de TN9, junto con los primeros 55 nucleótidos de los ligandos de la familia II relacionada TN7, TN21 y TN41, se introdujeron en un algoritmo informático para determinar los posibles plegamientos de estructuras secundarias de ARN (mfold 3.0, en <http://www.ibc.wustl.edu/~zucker/>. M. Zuker, D.H. Mathews & D.H. Turner. Algorithms and Thermodynamics for ARN Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. En: ARN Biochemistry and Biotechnology, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (1999)). Entre los muchos plegamientos de ARN posibles previstos por el algoritmo, se encontró una estructura común para cada oligonucleótido. Esta estructura, representada por el oligonucleótido TTA1 en la Figura 2, contiene tres tallos (en inglés "stems") que coinciden en una sola unión, la denominada unión de 3 tallos. Este plegamiento pone a los nucleótidos más conservados de los oligonucleótidos de la familia II en el área de unión. Por el contrario, el segundo tallo de TN9, TN7, TN21 y TN41 era de longitud y secuencia variable, lo que sugiere que la extensión del segundo tallo no es necesaria para la unión a la tenascina-C. Ensayando esta hipótesis en TN9 se descubrió que los nucleótidos 10-26 podían reemplazarse por un engarce de etilenglicol (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>. El engarce sirve como bucle sustituto y reduce el tamaño del aptámero. Además, bucles de cuatro nucleótidos (CACU o GAGA) que reemplazan a los nucleótidos 10-26 producen secuencias con alta afinidad por la tenascina-C. Estaría bien dentro de la experiencia en la técnica determinar otros bucles de nucleótidos u otros espaciadores que pudieran reemplazar a los nucleótidos de 10-26 para producir secuencias con alta afinidad por la tenascina-C.

Para aumentar la protección contra la actividad nucleasa, se localizaron posiciones de purina que podrían sustituirse con las correspondientes purinas con 2'-OMe. El oligonucleótido se dividió arbitrariamente en cinco sectores y todas las purinas dentro de cada sector se sustituyeron por el correspondiente nucleótido de purina con 2'-OMe, un total de cinco oligonucleótidos (Tabla 4, síntesis de Fase I). Se determinó la afinidad de cada oligonucleótido por la tenascina-C, y se descubrió que todas las purinas dentro de los sectores 1, 3 y 5 podían sustituirse sin una pérdida apreciable de afinidad. Dentro de los sectores 2 y 4, se sustituyeron purinas individuales por 2'-OMe purinas y se midió el efecto de la afinidad (Tabla 4, síntesis de Fase III). A partir de estos experimentos, se dedujo que la sustitución de los nucleótidos G9, G28, G31 y G34 con 2'-OMe G produce una pérdida en la afinidad por la tenascina-C. Por lo tanto, estos nucleótidos permanecen como 2'-OH purinas en el aptámero TTA1.

Después se sintetizó el aptámero TTA1 (Tabla 4) con el engarce (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> (Espaciador 18), un grupo protector terminal dT 3'-3' para la protección de exonucleasas, una hexilamina 5' (Tabla 4), y todas las purinas como 2'-OMe excepto las 5 G indicadas en la Tabla 4. Se generó un aptámero de control sin unión, TTA1.NB, deleccionando 5 nucleótidos en el extremo 3' para producir TTA1.NB. TTA1 se une a la tenascina-C con una constante de disociación en equilibrio (K<sub>d</sub>) de 5 nM, mientras que TTA1.NB tiene un valor de K<sub>d</sub> de >5 μM para la tenascina-C.

Los nucleótidos 10-26 pueden reemplazarse por un engarce de etilenglicol no nucleotídico. Por lo tanto, es probable que TTA1 pueda sintetizarse en dos piezas separadas, introduciéndose una ruptura en la posición del engarce de etilenglicol e introduciéndose nuevos extremos 5' y 3'. Después de la síntesis, las dos moléculas se incubarán conjuntamente para permitir la formación de un híbrido. Este método permite la introducción de grupos amina adicionales además de nucleótidos en los nuevos extremos 5' y 3'. Las nuevas funcionalidades podrían usarse para la bioconjugación. Además, la síntesis de dos piezas produce un mayor rendimiento de síntesis química debido al acortamiento de la longitud de las moléculas.

#### 50 Ejemplo 4

##### *Biodistribución de aptámeros marcados con Tc-99m en ratones que llevan tumores*

La biodistribución de aptámeros se ensayó conjugando un quelante de Tc-99m (Hi<sub>15</sub>: Hilger *et al.* (1998) Tet Lett 39: 9403-9406) al extremo 5' del oligonucleótido mostrado en la Figura 2, y radiomarcando el aptámero con Tc-99m. El aptámero en su forma marcada con Tc-99m se muestra en la Figura 10. TTA1 y TTA1.NB se conjugaron con Hi<sub>15</sub> a 50 mg/ml de aptámero en dimetilformamida al 30% con 5 equivalentes molares de Hi<sub>15</sub>-N-hidroxisuccinimida, tamponada en borato Na 100 mM pH 9,3 durante 30 minutos a temperatura ambiente. El aptámero en su forma marcada con Tc-99m se muestra en la Figura 10. La purificación por HPLC de fase inversa produjo Hi<sub>15</sub>-TTA1 y Hi<sub>15</sub>-TTA1.NB. Los oligonucleótidos después se marcaron con Tc-99m de la siguiente manera: a 1 nmol de Hi<sub>15</sub>-aptámero se le añadieron 200 μl de tampón fosfato sódico 100 mM, pH 8,5, 23 mg/ml de Tartrato Na y 50 μl de pertecnetato Tc-99m (5,0 mCi) eluido a partir de una columna de Mo-99 (Syncor, Denver) dentro de las 12 horas de uso. La reacción de marcaje se inició por la adición de 10 μl de SnCl<sub>2</sub> a 5 mg/ml. La mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a 90°C. La reacción se separó del Tc-99m que no había reaccionado por diálisis de centrifugación (en inglés "spin dialysis") a través de una membrana con un límite de PM de 30.000 (Centrex, Schleicher & Scheull) con dos lavados de 300 μl. Este protocolo de marcaje hace que el 30-50% del 99mTc añadido se incorpore con una actividad específica de 2-3 mCi/nmol de ARN. El Tc-99m se une a través de la 5'G como se muestra en la Figura 5.

Para los experimentos de biodistribución, se prepararon tumores de xenoinjerto de U251 como se indica a continuación: se cultivaron células U251 en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10% v/v (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). A ratones atímicos (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) se les inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células U251. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 200-300 mg (1-2 semanas), el aptámero marcado con Tc-99m se inyectó por vía intravenosa a 3,25 mg/kg. A los tiempos indicados, los animales se anestesiaron usando isoflurano (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA), la sangre se recogió por punción cardíaca y el animal se sacrificó y se recogieron los tejidos. Los niveles de Tc-99m se contaron usando un contador gamma (Wallac Oy, Turku, Finland). La captación del aptámero en los tejidos se midió como el % de dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g).

Se obtuvieron imágenes de los ratones usando una cámara gamma. Los ratones se pusieron en la cámara (Siemens, LEM+) con anestesia (isoflurano). Los datos se recogieron (de 30 segundos a 10 minutos) y se analizaron usando el software Nuclear MAC versión 3.22.2 (Scientific Imaging, CA) en un Power MAC G3 (Apple Computer, CA).

Experimentos de biodistribución. La Tabla 5, indicó una captación rápida y específica del aptámero en el tejido tumoral; el aptámero sin unión no permanece en el tumor. Los niveles sanguíneos de Tc-99m también se aclararon rápidamente. Después de tres horas, los niveles de Tc-99m que entraron en el tumor usando  $\text{Hi}_{15}$ -TTA1 tenían una vida media muy larga (> 18 horas). Esto indica que una vez que el aptámero ha penetrado en el tumor, el radiomarcador que lleva permanece en el tumor durante periodos de tiempo prolongados. Estos datos indican que los agentes citotóxicos, incluyendo radionúclidos y agentes no radiactivos, conjugados con el aptámero también permanecerán en el tumor con vidas medias prolongadas.

También aparece radiactividad de Tc-99m en otros tejidos, particularmente el intestino grueso y delgado. El patrón de aclaración hepatobiliar observado aquí puede ser alterado fácilmente por los expertos en la materia, por ejemplo alterando la hidrofilia del quelante de Tc-99m, cambiando el quelante o cambiando el par de radiometal/quelante conjuntamente.

Se obtuvieron imágenes del animal entero usando  $\text{Hi}_{15}$ -TTA1 marcado con Tc-99m a las 3 horas después de la inyección. Las imágenes obtenidas a partir de ratones en los que se había inyectado  $\text{Hi}_{15}$ -TTA1, pero no de ratones a los que se había inyectado  $\text{Hi}_{15}$ -TTA1.NB, muestran claramente el tumor (Figura 3). Es evidente más radiactividad en el tracto gastrointestinal, como se prevé por los experimentos de biodistribución.

#### Ejemplo 5

##### *Uso de TTA1 marcado con fluorescencia para localizar tenascina-C dentro del tejido tumoral*

##### *Materiales y Métodos*

Se sintetizaron TTA1 y TTA1.NB como se ha descrito anteriormente. Se conjugó succinimidil Rhodamine-Red-X (Molecular Probes, Eugene, OR) con el 5' amina de los aptámeros descritos anteriormente para la conjugación de  $\text{Hi}_{15}$ -NHS. Los aptámeros conjugados con Rhodamine-Red-X, TTA1-Red y TTA1.NB-Red, se purificaron por HPLC de fase inversa. Los cultivos de células U251 y el crecimiento tumoral en ratones desnudos fueron como se ha descrito anteriormente. Se inyectaron cinco nmol de TTA1-Red o TTA1.NB-Red por vía intravenosa en ratones desnudos y en el momento deseado el animal se anestesió, se le perfundió NaCl al 0,9% y se sacrificó. El tumor se extirpó y se puso en formalina. Después de 24 horas en formalina, se cortaron secciones de 10  $\mu\text{m}$  y se detectó la Rhodamine-Red-X usando un microscopio de fluorescencia (Eclipse E800, Nikon, Japan).

Resultados: TTA1-Red tiene una afinidad por la tenascina-C idéntica a la del aptámero parental no conjugado, TTA1, a 5 nM. Se compararon los niveles de fluorescencia del tumor de TTA1-Red y TTA1.NB-Red 10 minutos después de la inyección. El aptámero de unión, TTA1-Red, tiñe fuertemente el tumor pero no el tejido adyacente (Figura 4). Por el contrario, sólo se detecta autofluorescencia del tejido con TTA1.NB-Red. Estos resultados demuestran la utilidad del aptámero en la detección fluorescente de tenascina-C *in vivo*, y el aptámero puede usarse de forma similar para teñir secciones de tejido *ex vivo*.

#### Ejemplo 6

##### *Detección de Tumores In Vivo por el Aptámero TTA1 (ahora también conocido como GS7641): tipos de tumores adicionales*

El marcaje del aptámero, la biodistribución y los xenoinjertos de tumores de ratones desnudos se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Se sabe que muchos tipos de tumores humanos expresan la tenascina-C. Para evaluar la capacidad de TTA1/GS7641 de dirigirse a los tipos tumorales además de a glioblastomas, se cultivaron líneas de células tumorales humanas como tumores en ratones desnudos. Se evaluó en el tejido tumoral la expresión de tenascina-C humana, y en los tumores que expresaban tenascina-C humana se evaluó la captación del aptámero. La Figura 6 demuestra la captación del aptámero en varios tumores, incluyendo glioblastoma, mama, colorrectal y rhabdomyosarcoma. La captación específica en el tumor se demuestra por la comparación entre el aptámero de unión (TTA1/GS7641) y el aptámero sin unión

(TTA1.NB). Debe tenerse en cuenta que KB, un xenoinjerto que expresa TN-C de ratón pero no humana, no muestra captación tumoral. Este experimento extiende la observación de la captación del glioblastoma en otros carcinomas y sarcomas adicionales, e indica además que todos los tumores que expresan la tenascina-C humana muestran captación de TTA1/GS7641.

#### Ejemplo 7

##### *Marcaje Alternativo Usando In-111*

Se realizaron estudios de biodistribución y xenoinjertos tumorales como se ha descrito en el Ejemplo 4. Para acoplar DTPA y DOTA a TTA1/GS7641, el anhídrido cíclico de cada uno se incubó con TTA1/GS7641 que contenía amina en condiciones de pH neutro usando métodos estándar. Las estructuras del DTPA y los conjugados se muestran en la Figura 8 y la Figura 9, respectivamente, donde cada uno se ha marcado con In-111. El conjugado de DOTA tiene los mismo engarces que en el caso de DTPA. Los conjugados de DOTA y DTPA se marcaron con In-111 por incubación a 95°C en NaOAc 0,5 M, pH 5,5 durante 30 minutos. Después de retirar el radiomarcador no incorporado por diálisis de centrifugación en una membrana con un límite de 30K, el aptámero radiomarcado se transfirió a tampón fosfato salino para la inyección en los ratones que llevaban tumores.

La biodistribución del aptámero marcado con In-111 es notablemente diferente de la formulación marcada con Tc descrita en el Ejemplo 4. La Figura 7 demuestra que, en relación con TTA1/GS7641 marcado con Tc-99m, la radiactividad de TTA1/GS7641 marcado con In-111 en los intestinos se reduce en gran medida, con un aumento concomitante en la captación hepática y renal. Este experimento indica que las propiedades químicas del quelante tienen un gran efecto sobre la distribución del radiomarcador de TTA1/GS7641 dentro de un animal vivo. Los patrones de biodistribución que son diferentes de los de  $H_{i15}$ -TTA1/GS7641 pueden ser útiles para dirigirse a tumores en ciertas condiciones clínicas en las que no se desea la aclaración hepatobiliar. Estas condiciones incluyen, pero no se limitan a, aplicaciones de radioterapia así como formación de imágenes de intestinos, próstata y otras regiones abdominales.

TABLA 1

*Entrada de ARN y proteína de SELEX de tenascina-C*

|              | <b>Tenascina-C</b> | <b>ARN</b>     |
|--------------|--------------------|----------------|
| <b>Ronda</b> | (pMol/pocillo)     | (pMol/pocillo) |
| 1            | 12                 | 200            |
| 2            | 12                 | 200            |
| 3            | 12                 | 200            |
| 4            | 12                 | 200            |
| 5            | 2                  | 33             |
| 6            | 2                  | 33             |
| 7            | 2                  | 33             |
| 8            | 0,2                | 3,3            |

TABLA 2

*Entrada de ARN y proteína de SELEX de células/SELEX de tenascina-C*

|              | <b>Tenascina-C</b> | <b>ARN</b>     |
|--------------|--------------------|----------------|
| <b>Ronda</b> | (pMol/pocillo)     | (pMol/pocillo) |
| E9P1         | 2                  | 33             |
| E9P2         | 2                  | 33             |

Tabla 3: Secuencias de tenascina-C: SELEX de proteína purificada (secuencias de tenascina) y SELEX de células U251 + SELEX de proteína purificada (secuencias E9P2)

| Familia I  |    | SEC ID N°:      |   | SEC ID N°: |  |
|------------|----|-----------------|---|------------|--|
| TN11       | 4  | ggGAggAcGauGcgg | CAAUcAAACUcAcGGUUA UUCCC UCAUCUAUUAAGCUUCCCC cagacgacucgcccga     | 10 nM      |  |
| TN45       | 5  | gggaggacgaugcgg | CAUcUcCGAAAGACUCUUCUU GCAUCCUcUcACCCCC cagacgacucgcccga           | 30 nM      |  |
| TN4        | 6  | gggaggacgaugcgg | CAACCUc GAAAGACUUIUCCCC GCAUCACUGUGUACUCCCC cagacgacucgcccga      | 40 nM      |  |
| TN22       | 7  | gggaggacgaugcgg | CAACCUc GAUAGACUUIUCCCC GCAUCACUGUGUACUCCCC cagacgacucgcccga      | 40 nM      |  |
| TN32 (2)   | 8  | gggAggAcGauGcgg | cAaCCUcAA UCUIGACAUUUUCCC GcACCUAAAUUUUG CCCC cagacgacucgcccga    | 15 nM      |  |
| TN14       | 9  | gggAggAcGauGcgg | CAACGGAUC ACUUAAGUUUUUUU GCAUCUGCUAGC CUCCCC cagacgacucgcccga     | 20 nM      |  |
| TN44 (3)   | 10 | gggaggacgaugcgg | ACGCCAGCCAUUGACCCUCGUUCCACUAUCCAUCCCCC cagacgacucgcccga           | 10 nM      |  |
| TN29(2)    | 11 | gggaggacgaugcgg | CCAACCUCAUUUUGACAUUCCGCGCACCUAAUUGCCCC cagacgacucgcccga           | 25 nM      |  |
| consensus: | 12 |                 | GACNYUUCCN GCAYC  |            |  |
| Familia II |    |                 |   |            |  |
| E9P2-4(6)  | 13 | gggaggacgaugcgg | AACCCUAU ACGCGA ACCGACCAACAUGCCUCCUGGCCCC cagacgacucgcccga        | 2 nM       |  |
| E9P2-1(14) | 14 | gggAggacgaugcgg | UGCCAUAG AAGCGU GCCGCUAAUGCUAACGCCUCCCC cagacgacucgcccga          | 8 nM       |  |
| E9P2-2(16) | 15 | gggaggacgaugcgg | UGCCACU AUGCGU GCCGAAACAAUUCGCCUCUACCC cagacgacucgcccga           | 20 nM      |  |
| TN7 (3)    | 16 | gggaggacgaugcgg | AACAUUCCCAUGCGUCGCC AUACC GGAUAAUUGCUCC cagacgacucgcccga          | 10 nM      |  |
| TN21(4)    | 17 | gggaggacgaugcgg | ACUGGACCAACCUGCGCGAUACCCGGAUUAUUGCUCC cagacgacucgcccga            | 5 nM       |  |
| TN9(10)    | 18 | gggaggacgaugcgg | AACAUGCACUGUGCGCCGUAU GGAUGUUUUGCUCCCCUG cagacgacucgcccga         | 20 nM      |  |
| TN41       | 19 | gggaggacgaugcgg | UUAAGUCUCGGUUGAAU GCGCAUCCC AGAUGCCCCUGACC cagacgacucgcccga       |            |  |
| consenso:  |    |                 | GGGUCGCCCG  |            |  |
| Huérfanos  |    |                 |   |            |  |
| E9P2-17    | 20 | gggaggacgaugcgg | AUGGCAAGUCGAACCAUCCCCACGCUUUCUCCUGUUCCCC cagacgacucgcccga         |            |  |
| E9P2-48    | 21 | gggaggacgaugcgg | GAAGUUUcUUCUGCCUUGGUUUCGAUUGGCGCCUccccCC cagacgacucgcccga         |            |  |
| E9P2-14    | 22 | gggaggacgaugcgg | UCGAGCGGUCGACCGUCAACAAGAAUAAAGGUGUCCCUUG cagacgacucgcccga         |            |  |
| E9P2-17    | 23 | gggaggacgaugcgg | AUGGCAAGUCGAACCAUCCCCACCGCUUUCUCCUGUUCCCC cagacgacucgcccga        |            |  |
| E9P2-22    | 24 | gggaggacgaugcgg | ACUAGAcgCGAGUCCAUACUUGCCCAUUGCCCAAAABAAAACcUCCCC cagacgacucgcccga |            |  |
| E9P2-40    | 25 | gggaggacgaugcgg | GAGAUAACAUAUCCUCUAGUUGGUUCCCAACCACACACCCC cagacgacucgcccga        |            |  |
| E9P2-41    | 26 | gggaggacgaugcgg | ACGAGCGUCUCAUGACACACUAUUUCGUUCACAGUGUGCA cagacgacucgcccga         |            |  |
| TN18       | 27 | gggaggacgaugcgg | UGACCUCGAUUGACUCCACCUAUUAACAUCUCCCCCCC cagacgacucgcccga           | 145 nM     |  |
| TN20       | 28 | gggaggacgaugcgg | UCGACCUCGAUUGACUCCACCUAUUAACAAGCCUUCUCC cagacgacucgcccga          |            |  |
| TN51       | 29 | gggaggacgaugcgg | AGAACUCAUCCUAAGCGUCUAAACAUAUUGUCCGACCC cagacgacucgcccga           |            |  |
| TN8        | 30 | gggaggacgaugcgg | AUAAUcGACACCAACCAGGUCGCCGAAUAUCAUCCCUUUG cagacgacucgcccga         | >10 uM     |  |

| SEC ID N°.                                     |    | (continuación)  |   | Familia I |       |
|--|----|-----------------|---|-----------|-------|
|  |    |                 |   |           |       |
| TN27   | 31 | gggaggacgaugcgg | AAACCAACCGUUGACAC CUUUUCGUUUCCGGAAAGUCCC cagacgacucgcccga   | 110 nM    | 10 nM |
| TN39   | 32 | gggaggacgaugcgg | AAGCAACCCUCUAGUCAGCCUUUCGUUUCCGACGCCACC cagacgacucgcccga    |           |       |
| TN24   | 33 | gggaggacgaugcgg | gACCAACUAAACUGUUCGAAAGCUGGaCAUGUCCUGACGC cagacgacucgcccga   |           |       |
| TN5  | 34 | gggaggacgaugcgg | ACCAACUAAACUGUUCGAAAGCUGGAACACGUCUCCUGACGC cagacgacucgcccga |           |       |
| TN36   | 35 | gggaggacgaugcgg | ACCAACUAAACUGUUCGAAAGCUGAAGACAGUCCAGACGC cagacgacucgcccga   | >10 uM    |       |
| TN6  | 36 | gggaggacgaugcgg | ACCAACUAAACUGUUCGAAAGCUGGAACACGUAUCUGACGC cagacgacucgcccga  |           |       |
| TN10   | 37 | gggaggacgaugcgg | ACCAACUAAACUGUUCGAAAGCUGGAUACGUCUCCUGACGC cagacgacucgcccga  |           |       |
| TN1  | 38 | gggaggacgaugcgg | AAGUUUA GuGCUCCAGUUCGACACUCCUcUACUACAGCCC cagacgacucgcccga  |           |       |
| TN109  | 39 | gggaggacgaugcgg | AgCCAGAGCCUcUcAGUUCaCAGAAUuACCcACUGG cagacgacucgcccga       |           |       |
| TN110  | 40 | gggaggacgaugcgg | ACCUAACUCAAUACAGGAACCAACCUAGCACUCUCAUGGC cagacgacucgcccga   |           |       |
| Aptámeros SELEX de U251, Elución con EDTA (E9) |    |                 |   |           |       |
| <u>E9-8 (3)</u>                                | 41 | gggaggacgaugcgg | GAGAUCAACAUUCCUCUAGUUUGGUUCCAAACCUACACCCC cagacgacucgcccga  |           |       |
| <u>E9-15</u>                                   | 42 | gggaggacgaugcgg | AUCUCGAUCCUUCAGCACUUAUUCUUAUUCUUAUUGCCC cagacgacucgcccga    |           |       |
| <u>E9-6</u>                                    | 43 | gggaggacgaugcgg | ACGAUCCUUUCCUUA CAUUUCAUUAUUUCUUGUGCCC cagacgacucgcccga     |           |       |
| <u>E9-5(2)</u>                                 | 44 | gggaggacgaugcgg | UGACGACAACUCGACUG CAUAUCUCACAACUCCUGUGCCC cagacgacucgcccga  |           |       |
| <u>E9-3 (6)</u>                                | 45 | gggaggacgaugcgg | ACUAGACCGCGAGUC CAUUCAAAUUGGCCAAAACCUCCCC cagacgacucgcccga  |           |       |
| <u>E9-9</u>                                    | 46 | gggaggacgaugcgg | GCGCAUCGAGCAACAUCCGAUUCGGAUUCUCCACUCCCC cagacgacu gcccga    |           |       |



**Tabla 4: Sustituciones 2'-OMe, Deleciones Internas, TTA1 y TTA1.NB**

| Fase I. 2'-OMe. Afinidad.                              |  | SEC ID N°: | Kd.     |
|--|--|------------|---------|
| Sequence   |  |            |         |
| TN9.3  | gggagacgaugcggAACAAUGCACUCGUCGCCCGUA <u>AAUGGAUUUUUGCU</u> 5   | 47         | >10 uM  |
| TN9.4  | GGGAGGACGAUGCGGAACAAUGCACUCGUCGCCGUA <u>AAUGGAUUUUWGCUC</u> CCCU65                                       | 48         | 2 nM    |
| TN9.4M1  | 66676GACGAUGCGGAACAAUGCACUCGUCGCCGUA <u>AAUGGAUUUUUGCU</u> CCCU65  | 49         | 6 nM    |
| TN9.4M2  | GGGAG67C67U6C6GAACAAUGCACUCGUCGCCGUA <u>AAUGGAUUUUUGCU</u> CCCU65  | 50         | 20 nM   |
| TN9.4M3  | GGGAGGACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCGUA <u>AAUGGAUUUUUGCU</u> CCCU65  | 51         | 7 nM    |
| TN9.4M4  | GGGAGGACGAUGCGGAACAAUGCACUC6C6C6U <u>AAUGGAUUUUUGCU</u> CCCU65   | 52         | nb      |
| TN9.4M5  | GGGAGGACGAUGCGGAACAAUGCACUCGUCGCCG77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65   | 53         | 4 nM    |
| TN9.4Me  | 6667667C67U6C6677C77U6C7CUC6U6C6C6U77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65  | 54         | 10 nM   |
| 6=mG; 7=mA; 5=protección terminal 3'-3'; 1= hexilamina |  |            |         |
| Fase III. 2'-OMe. Afinidad.                            |  | SEC ID N°: | Kd.     |
| Sequence   |  |            |         |
| TN9.4M1235   | 16667667C67U6C6677C77U6C7CUCGUCGCCCGU77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65                                      | 55         | 16,5 nM |
| TN9.4M135G6  | 1666766ACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCCGU77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65                                      | 56         | 2,2 nM  |
| TN9.4M135A7  | 166676G7CGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCCGU77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65                                      | 57         | 1,7 nM  |
| TN9.4M135G9  | 166676GAC6AUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCCGU77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65                                      | 58         | 7,7 nM  |
| TN9.4M135A10   | 166676GACG7UGCG677C77U6C7CUCGUCGCCCGU77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65                                      | 59         | 1,3 nM  |
| TN9.4M135G12G14  | 166676GACGAU6C6677C77U6C7CUCGUCGCCCGU77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65                                      | 60         | 2,5 nM  |
| TN9.4M135G28   | 166676GACGAUGCG677C77U6C7CUC6UGCGCCG77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65                                       | 61         | 37 nM   |
| TN9.4M135G31   | 166676GACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCG77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65  | 62         | 55 nM   |
| TN9.4M135G34   | 166676GACGAUGCG677C77U6C7CUCGUCGCCG77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65  | 63         | 7 nM    |
| TTA1:  | 5'-1G667667CG-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> -CGUCGCCCGU77U <u>667U6UUUU6CU</u> CCCU65 | 64         | 5 nM    |
| TTA1.NB:   | 5'-1G667667CG-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> -CGUCGCCCGU77U <u>667U6UUUU6CU</u> 5      | 65         | >5 uM   |

# ES 2 310 989 T3

TABLA 5

*Biodistribución de Tc-99m-TTA1 y -TTA1.NB*

|    |        | min. | TTA1           | TTA1.NB        |           | min. | TTA1           | TTA1.NB         |
|----|--------|------|----------------|----------------|-----------|------|----------------|-----------------|
| 5  | tumor  | 2.   | 4,470 ± 0,410  | 4,510 ± 0,300  | riñón     | 2    | 44,430 ± 4,280 | 54,470 ± 1,210  |
|    |        | 10   | 5,940 ± 0,590  | 3,020 ± 0,210  |           | 10   | 18,810 ± 0,940 | 14,320 ± 2,080  |
|    |        | 60   | 2,689 ± 0,310  | 0,147 ± 0,018  |           | 60   | 1,514 ± 0,040  | 0,637 ± 0,111   |
| 10 |        | 180  | 1,883 ± 0,100  | 0,043 ± 0,004  |           | 180  | 0,286 ± 0,028  | 0,221 ± 0,021   |
|    |        | 570  | 1,199 ± 0,066  | 0,018 ± 0,001  |           | 570  | 0,140 ± 0,006  | 0,100 ± 0,013   |
|    |        | 1020 | 1,150 ± 0,060  | N/A            |           | 1020 | 0,081 ± 0,005  | N/A             |
| 15 | sangre | 2    | 18,247 ± 1,138 | 15,013 ± 0,506 | int. del. | 2    | 3,690 ± 0,250  | 3,120 ± 0,100   |
|    |        | 10   | 2,265 ± 0,245  | 2,047 ± 0,195  |           | 10   | 7,010 ± 0,070  | 6,440 ± 0,250   |
|    |        | 60   | 0,112 ± 0,003  | 0,102 ± 0,019  |           | 60   | 15,716 ± 2,036 | 14,649 ± 0,532  |
| 20 |        | 180  | 0,032 ± 0,001  | 0,034 ± 0,003  |           | 180  | 1,479 ± 0,710  | 1,243 ± 0,405   |
|    |        | 570  | 0,013 ± 0,001  | 0,011 ± 0,001  |           | 570  | 0,219 ± 0,147  | 0,159 ± 0,067   |
|    |        | 1020 | 0,006 ± 0,001  | N/A            |           | 1020 | 0,280 ± 0,243  | N/A             |
| 25 | pulmón | 2    | 8,970 ± 1,210  | 8,130 ± 0,960  | int. gr.  | 2    | 2,340 ± 0,240  | 2,280 ± 0,180   |
|    |        | 10   | 2,130 ± 0,080  | 1,940 ± 0,230  |           | 10   | 0,890 ± 0,040  | 0,770 ± 0,070   |
|    |        | 60   | 0,157 ± 0,011  | 0,120 ± 0,005  |           | 60   | 10,799 ± 5,381 | 21,655 ± 11,676 |
| 30 |        | 180  | 0,048 ± 0,006  | 0,041 ± 0,003  |           | 180  | 26,182 ± 7,839 | 18,023 ± 3,485  |
|    |        | 570  | 0,028 ± 0,006  | 0,017 ± 0,002  |           | 570  | 1,263 ± 0,706  | 0,716 ± 0,179   |
|    |        | 1020 | 0,007 ± 0,001  | N/A            |           | 1020 | 0,298 ± 0,167  | N/A             |
| 35 | hígado | 2    | 9,120 ± 0,530  | 7,900 ± 0,350  | músculo   | 2    | 1,270 ± 0,130  | 1,490 ± 0,050   |
|    |        | 10   | 12,460 ± 1,250 | 9,100 ± 0,830  |           | 10   | 0,870 ± 0,090  | 1,840 ± 1,000   |
|    |        | 60   | 1,234 ± 0,091  | 0,423 ± 0,095  |           | 60   | 0,064 ± 0,003  | 0,050 ± 0,004   |
| 40 |        | 180  | 0,401 ± 0,084  | 0,211 ± 0,059  |           | 180  | 0,016 ± 0,002  | 0,011 ± 0,001   |
|    |        | 570  | 0,104 ± 0,017  | 0,058 ± 0,003  |           | 570  | 0,011 ± 0,002  | 0,007 ± 0,001   |
|    |        | 1020 | 0,075 ± 0,003  | N/A            |           | 1020 | 0,003 ± 0,0003 |                 |
| 45 | bazo   | 2    | 5,100 ± 0,410  | 4,860 ± 0,130  |           |      |                |                 |
|    |        | 10   | 2,460 ± 0,210  | 1,220 ± 0,120  |           |      |                |                 |
|    |        | 60   | 0,643 ± 0,076  | 0,110 ± 0,015  |           |      |                |                 |
| 50 |        | 180  | 0,198 ± 0,026  | 0,038 ± 0,005  |           |      |                |                 |
|    |        | 570  | 0,062 ± 0,004  | 0,020 ± 0,001  |           |      |                |                 |
|    |        | 1020 | 0,030 ± 0,003  | N/A            |           |      |                |                 |
| 55 |        |      |                |                |           |      |                |                 |

## Referencias citadas en la descripción

60 Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

65

## ES 2 310 989 T3

### Documentos de patentes citados en la descripción

- US 07536428 B [0004] [0030]
- US 08264029 B [0007] [0034]
- 5 • US 5475096 A [0004] [0030]
- US 5637459 A [0008] [0034] [0035]
- US 5270163 A [0004] [0030]
- US 5683867 A [0008] [0035]
- 10 • WO 9119813 A [0004] [0030]
- US 08434465 B [0009] [0046]
- US 07960093 B [0006] [0033]
- US 43442595 A [0018]
- US 5707796 A [0006] [0033]
- US 5789157 A [0018] [0037] [0056]
- 15 • US 08123935 B [0006] [0033]
- US 5496938 A [0033] [0036]
- US 5763177 A [0006] [0033]
- US 5705337 A [0033]
- US 09093293 B [0006] [0033]
- US 08434425 B [0037] [0056]
- 20 • US 5580737 A [0006] [0007] [0033]
- US 11799193 A [0038]
- US 5567588 A [0006] [0033]
- US 08993765 B [0045]
- 25 • US 5660985 A [0007] [0034] [0038]
- US 09364902 B [0080]

### Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- 30 **ERICKSON; BOURDON.** *Ann Rev Cell Biol*, 1989, vol. 5, 71-92 [0002]
- SOINI et al.** *Am J Clin Pathol*, 1993, vol. 100 (2), 145-50 [0002]
- KOUKOULIS et al.** *Hum Pathol*, 1991, vol. 22 (7), 636-43 [0002]
- 35 **BORSI et al.** *Int J Cancer*, 1992, vol. 52 (5), 688-92 [0002]
- KOU KOULIS et al.** *JSubmicrosc CytolPathol*, 1993, vol. 25 (2), 285-95 [0002]
- 40 **IBRAHIM et al.** *Hum Pathol*, 1993, vol. 24 (9), 982-9 [0002]
- RIEDL et al.** *Dis Colon Rectum*, 1998, vol. 41 (1), 86-92 [0002]
- TUOMINEN; KALLIOINEN.** *J Cutan Pathol*, 1994, vol. 21 (5), 424-9 [0002]
- 45 **NATALI et al.** *Int J Cancer*, 1990, vol. 46 (4), 586-90 [0002]
- ZAGZAG et al.** *Cancer Res*, 1995, vol. 55 (4), 907-14 [0002]
- 50 **HASEGAWA et al.** *Acta Neuropathol (Berl)*, 1997, vol.93 (5), 431-7 [0002]
- SAXON et al.** *Pediatr Pathol Lab Med*, 1997, vol. 17 (2), 259-66 [0002]
- HASEGAWA et al.** *Hum Pathol*, 1995, vol. 26 (8), 838-45 [0002]
- 55 **SCHALKWIJK et al.** *Br J Dermatol*, 1991, vol. 124 (1), 13-20 [0002]
- FUKUMOTO et al.** *J Atheroscler Thromb*, vol. 5 (1), 29-35 [0002]
- 60 **WALLNER et al.** *Circulation*, 1999, vol. 99 (10), 1284-9 [0002]
- PAGANELLI et al.** *Eur J Nucl Med*, 1999, vol. 26 (4), 348-57 [0002]
- PAGAN ELLI et al.** *Eur J Nucl Med*, 1994, vol. 21 (4), 314-21 [0002]
- 65 **BIG NER et al.** *J C/ZnOnco*, 1998, vol. 16(6), 2202-12 [0002]

## ES 2 310 989 T3

**MERLO** *et al.* *Int J Cancer*, 1997, vol. 71 (5), 810-6 [0002]

**ZUKER**. *Science*, 1989, vol. 244, 48-52 [0015]

5 **FITZWATER; POLISKY**. *Methods Enzymol.*, 1996, vol. 267, 275-301 [0051]

**TUERK; GOLD**. *Science*, 1990, vol. 249 (4968), 505-10 [0051]

*Hum. Hered.*, 1971, vol. 21, 238 [0053]

10 **SAMBROOK** *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0055]

**GREEN** *et al.* *Chem Biol*, 1995, vol. 2 (10), 683-95 [0063]

15 **HILGER** *et al.* *Tet Lett*, 1998, vol. 39, 9403-9406 [0068]

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Complejo que comprende un ligando de ácido nucleico para tenascina-C, donde

- (a) dicho ligando se selecciona del grupo que consiste en las secuencias indicadas en las SEC ID N°: 4-64;
- (b) dicho ligando tiene una homología mayor del 70% y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a tenascina-C que un ligando según (a); o
- (c) dicho ligando tiene sustancialmente la misma estructura que la que se postula usando RMN o por alineación de secuencias usando el programa Zukerfold y tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la tenascina-C que un ligando según (a);

y un marcador.

2. Complejo de la reivindicación 1, donde dicho ligando es



donde:

todas las pirimidinas son 2' F;

6 = 2'OMe G;

7 = 2'OMe A;

5 = 3'-3' dT; y

B = engarce

3. Complejo de la reivindicación 2, donde B se selecciona del grupo que consiste en hexilamina y  $(CH_2CH_2O)_6$ .

4. Complejo de la reivindicación 1, donde dicho marcador se selecciona del grupo que consiste en radionúclidos, fluoróforos, compuestos magnéticos y biotina.

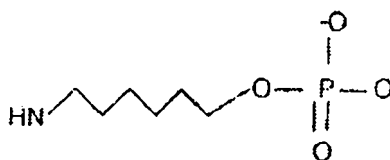
5. Complejo de la reivindicación 4, donde dicho radionúclido se selecciona del grupo que consiste en tecnecio-99m (Tc-99m), Re-188, Cu-64, Cu-67, F-18,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{111}In$ ,  $^{32}P$  y  $^{186}Re$ .

6. Complejo de la reivindicación 5, donde dicho marcador es tecnecio-99m.

7. Complejo de la reivindicación 6, donde dicho ligando de ácido nucleico de tenascina-C comprende un engarce.

8. Complejo de la reivindicación 7, donde dicho engarce es  $(CH_2CH_2O)_6$ .

9. Complejo de la reivindicación 7, donde dicho engarce tiene la estructura



10. Complejo de la reivindicación 7, donde dicho ligando de ácido nucleico es



donde:

todas las pirimidinas son 2' F;

6 = 2'OMe G;

7 = 2'OMe A;



## ES 2 310 989 T3

16. Procedimiento para la preparación de un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, comprendiendo dicho procedimiento la unión covalente de dicho ligando de ácido nucleico de tenascina-C con dicho marcador.

5 17. Uso del complejo marcador-ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 en la fabricación de una composición farmacéutica destinada a la detección de la presencia de una enfermedad que está expresando tenascina-C en un tejido biológico, el cual puede contener dicha enfermedad.

10 18. Uso de la reivindicación 17, que comprende además unir un agente terapéutico o de diagnóstico a dicho complejo.

15 19. Uso del complejo marcador-ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 en la fabricación de una composición farmacéutica para administrar un agente terapéutico a una enfermedad que está expresando tenascina-C, donde el agente terapéutico se une de manera covalente a dicho ligando para formar dicho complejo.

20 20. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 17-19, donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer, soriasis y aterosclerosis.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

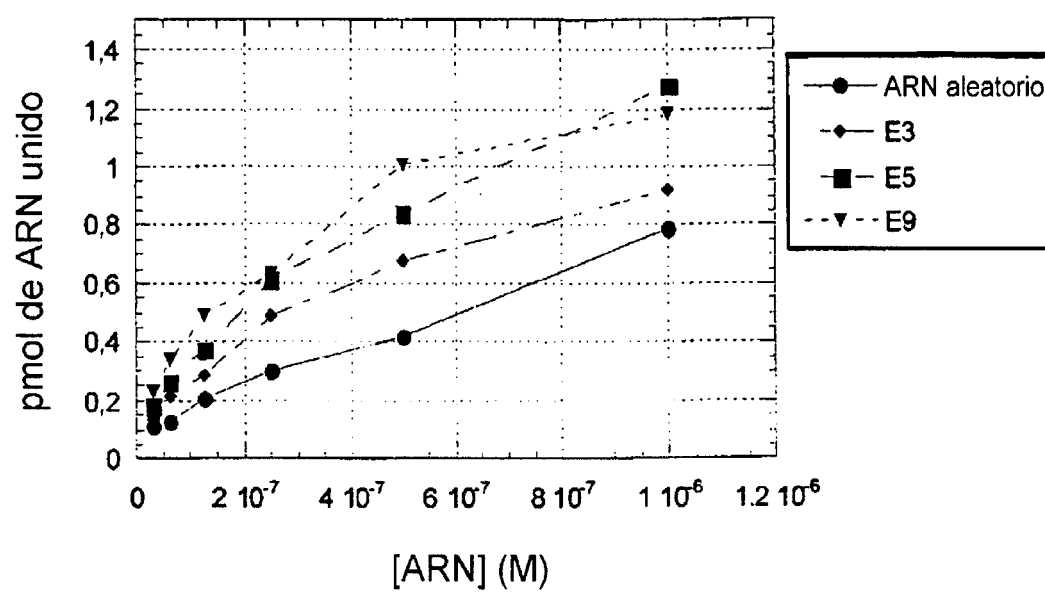
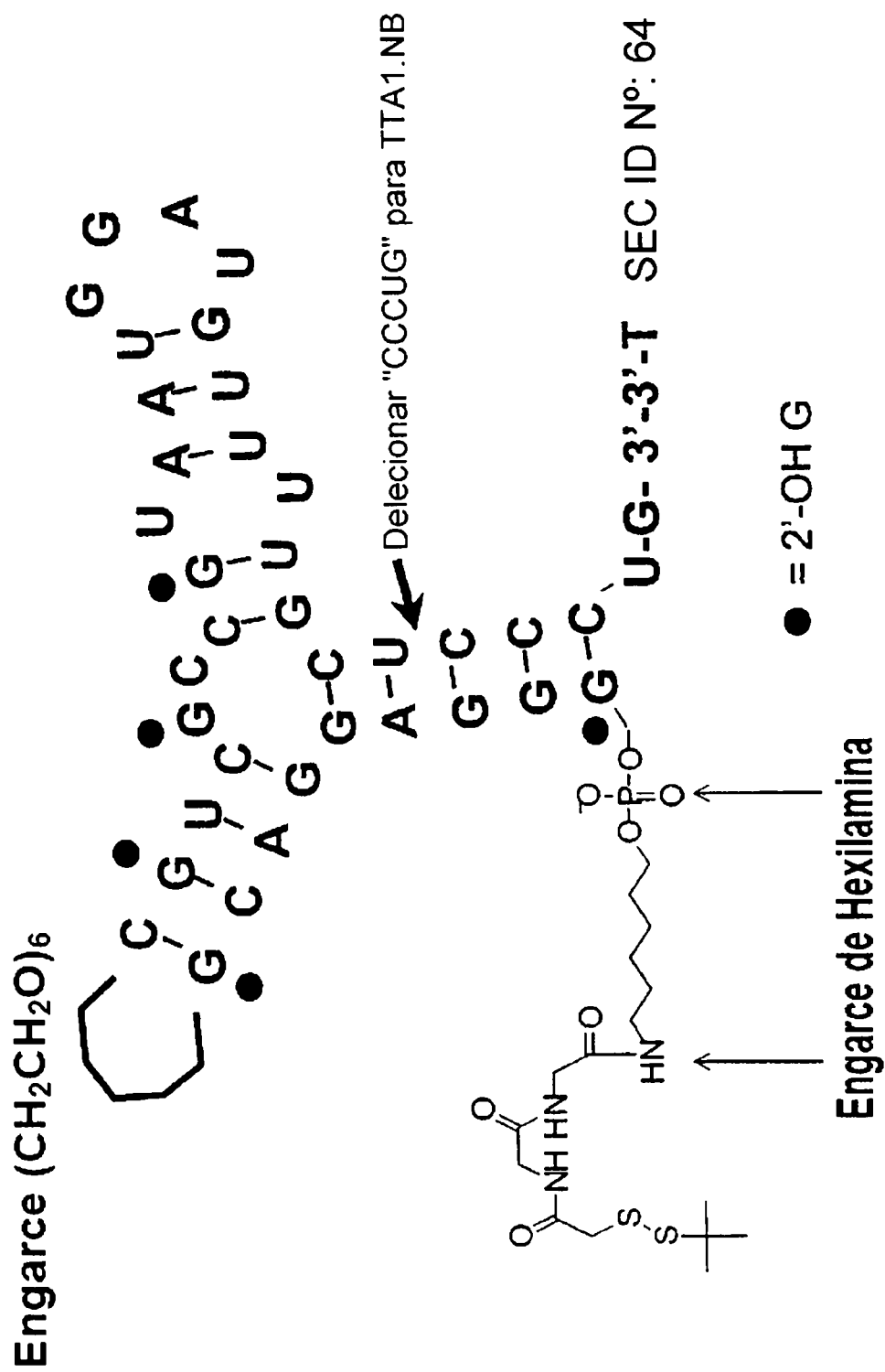


FIGURA 1





## FIGURA 2

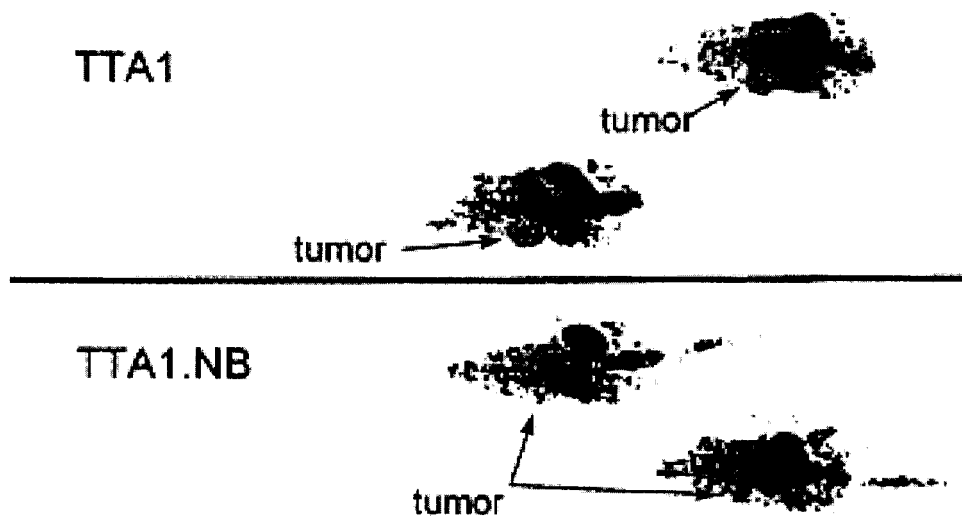


FIGURA 3

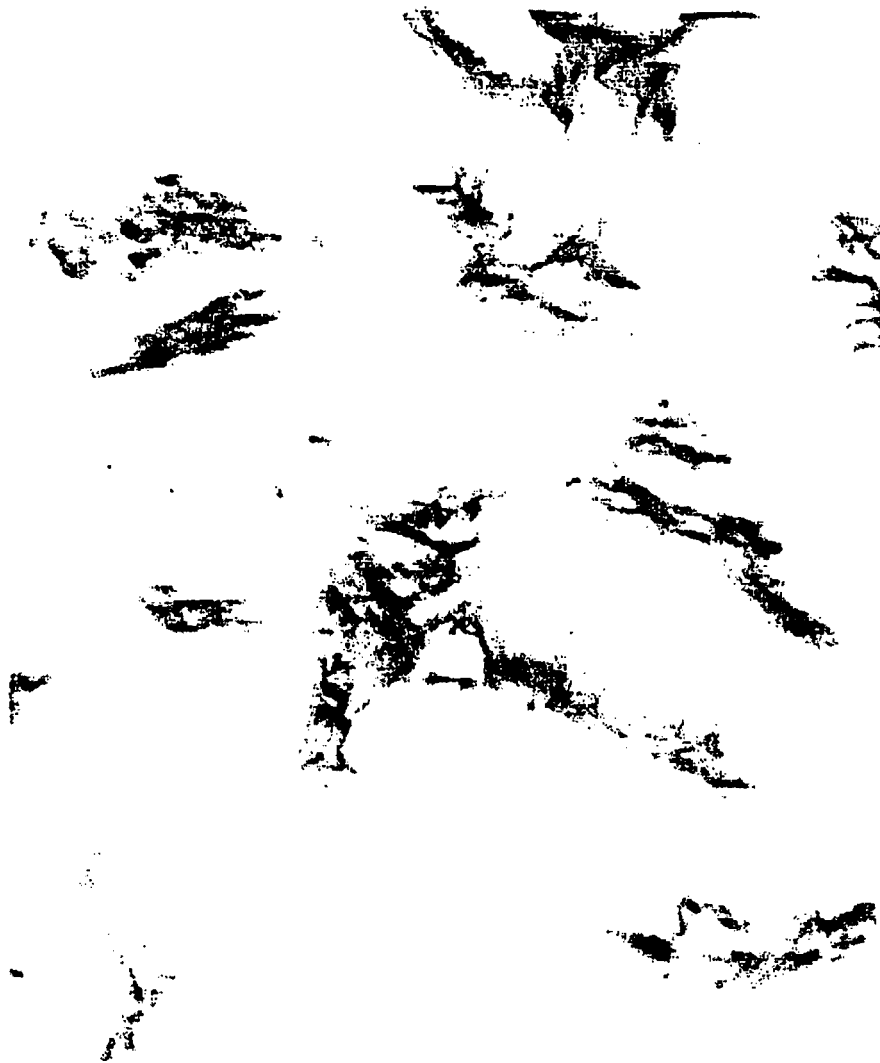


FIGURA 4

ENGARCE

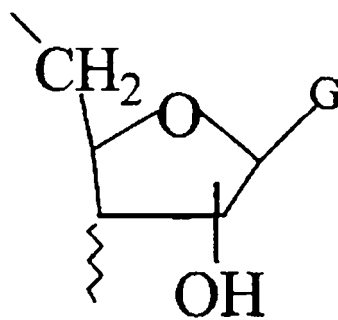


FIGURA 5

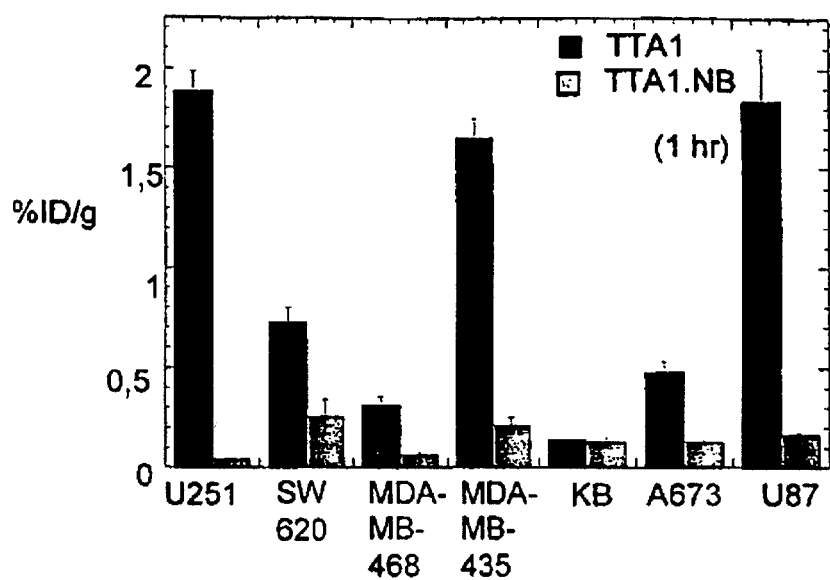


FIGURA 6

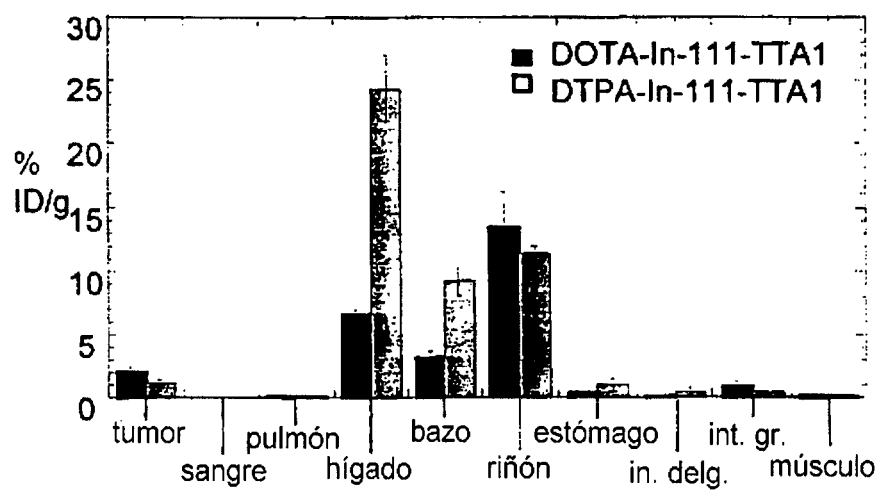


FIGURA 7

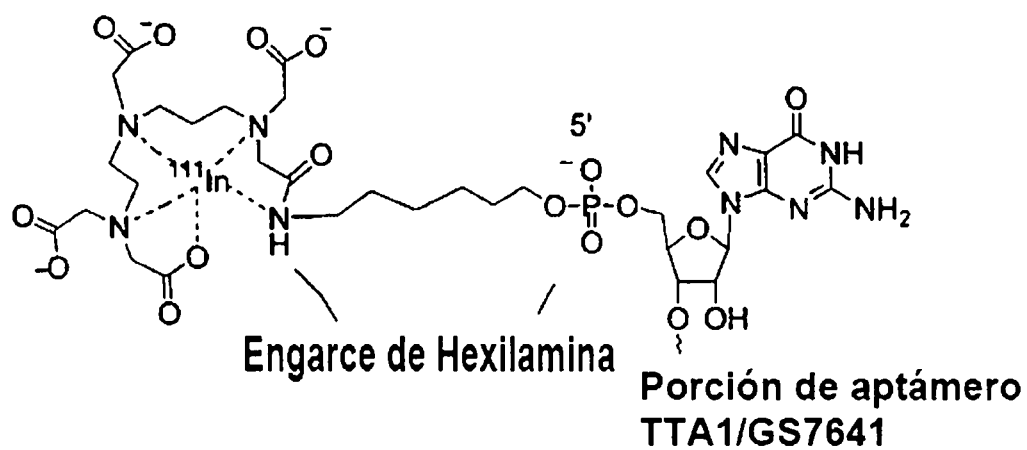


FIGURA 8

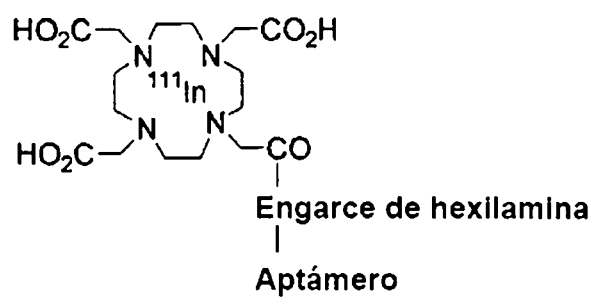
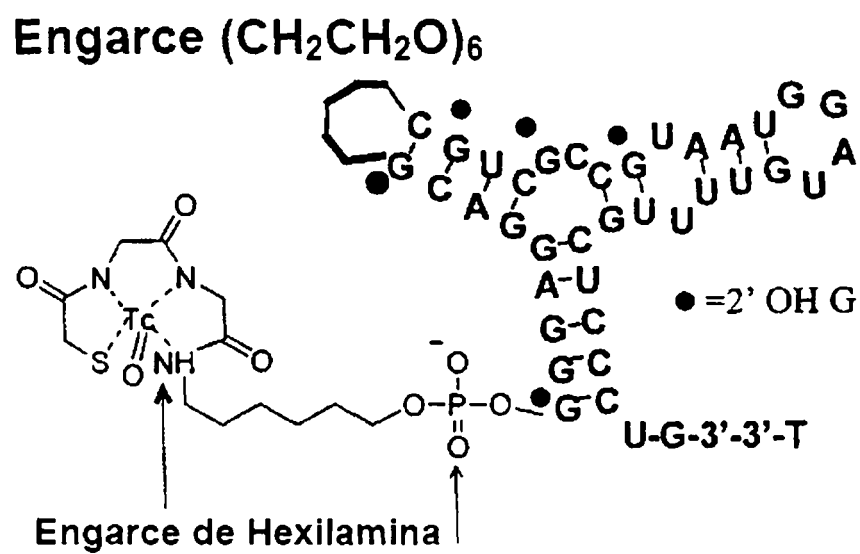


FIGURA 9



Todas las A = 2'-OMe  
 Todas las G, excepto cuando se indica, están modificadas con 2'-OMe  
 Todas las C están modificadas con 2'F  
 Todas las U's están modificadas con 2'F

**FIGURA 10**

# ES 2 310 989 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> NeXstar Pharmaceuticals, Inc.

5 <120> Ligandos de Ácido Nucleico de Tenascina-C  
<130> NEX 86/PCT  
<140>  
<141>

10 <150> 09/364.902  
<151> 1999-07-29  
<160> 65

15 <170> PatentIn Ver. 2.0  
<210> 1  
<211> 71  
<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

25 <400> 1  
  
tcgcgcgagt cgtctgnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnccgc 60  
atcgtccctcc c 71

30 <210> 2  
<211> 32  
<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

40 <400> 2  
  
taatacgact cactataggg aggacgatgc gg 32

45 <210> 3  
<211> 16  
<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

55 <400> 3  
  
tcgcgcgagt cgtctg 16

60 <210> 4  
<211> 71  
<212> ARN

65 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico



ES 2 310 989 T3

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> modified base

<222> (1)..(71)

5 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.

<400> 4

10           gggaggacga ugcggcaauc aaaaCucacg uuauucccuc aucuauuagc uuccccagac 60  
            gacucgcccg a 71

<210> 5

<211> 71

<212> ARN

### <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$ 

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> modified base

25  $\langle 222 \rangle$  (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

<400> 5

30 gggaggacga ugcggcaauc uccgaaaaag acucuuccug cauccucuca cccccagac 60  
gacucqcccq a 71

<210> 6

35 <211> 71

<212> ARN

### <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$ 

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> modified base

45  $\langle 222 \rangle$  (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

<400> 6

50                    gggaggacga ugcggcaacc ucgaaagacu uuucccgcau cacuguguac uccccagac 60  
                  gacucgcccg a 71

55  $\langle 210 \rangle$  7

<211> 71

<212> ARN

### <213> Secuencia Artificial

60  $\langle 220 \rangle$ 

### <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

 $\langle 220 \rangle$ 

65 &lt;221&gt; modified\_base

<222> (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

## ES 2 310 989 T3

<400> 7  
 gggaggacga ugcgggcaacc ucgauagacu uuucccgcau cacuguguac uccccagac 60  
 gacucgcccg a 71  
 5  
 <210> 8  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 15 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 20 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 <400> 8  
 gggaggacga ugcgggcaacc ucaaucuuga cauuucccg accuaaaauu gccccagac 60  
 gacucgcccg a 71  
 25  
 <210> 9  
 <211> 71  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 35 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 40 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 <400> 9  
 gggaggacga ugcgggcaaac gaucacuuac cuuuccugca ucugcuagcc uccccagac 60  
 gacucgcccg a 71  
 45  
 <210> 10  
 <211> 71  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 55 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 60 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 <400> 10  
 gggaggacga ugcgggacgcc agccauugac ccucgcuucc acuaauuccau cccccagac 60  
 gacucgcccg a 71  
 65

## ES 2 310 989 T3

<210> 11  
 <211> 70  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 10 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(70)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 15 <400> 11  
 gggaggacga ugcggccaac cucauuuga cacuucgccg caccuaauug cccccagacg 60  
 20 acucgcccga 70  
 <210> 12  
 <211> 15  
 25 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 30 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(15)  
 35 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 <400> 12  
 40 gacnyuuccn gcayc 15  
 <210> 13  
 <211> 71  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 50 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 55 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 <400> 13  
 60 gggaggacga ugcggaaccc auaacgcgaa ccgaccaaca ugccucccg uccccagac 60  
 gacucgcccg a 71  
 <210> 14  
 <211> 70  
 65 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

## ES 2 310 989 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
<220>  
<221> modified\_base  
5 <222> (1)..(70)  
<223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
  
<400> 14  
10  
    **gggaggacga ugcggugccc auagaagcgu gccgcuaaug cuaacgccc cccccagacg 60**  
    **acucgcccga 70**  
  
15 <210> 15  
    <211> 71  
    <212> ARN  
20 <213> Secuencia Artificial  
    <220>  
    <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
    <220>  
25 <221> modified\_base  
    <222> (1)..(71)  
    <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
30 <400> 15  
    **gggaggacga ugcggugccc acuaugcgug ccgaaaaaca uuucccccuc uaccccagac 60**  
    **gacucgcccg a 71**  
35  
    <210> 16  
    <211> 71  
    <212> ARN  
40 <213> Secuencia Artificial  
    <220>  
    <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
45 <220>  
    <221> modified\_base  
    <222> (1)..(71)  
50 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
    <400> 16  
    **gggaggacga ugcgggaacac uuucccaugc gucgcgauac cggauauauu gcucccagac 60**  
55 <220>  
    **gacucgcccg a 71**  
60  
    <210> 17  
    <211> 71  
    <212> ARN  
65 <213> Secuencia Artificial  
    <220>  
    <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
    <220>  
    <221> modified\_base

## ES 2 310 989 T3

<222> (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

5 <400> 17

```

    gggaggacga ugcggacugg accaaaaccgu cggcgauacc cggauacuuu gcucccagac 60
    gacucgcccg a                                     71

```

10 <210> 18

<211> 71

<212> ARN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

<220>

20 <221> modified\_base

<222> (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

25 <400> 18

```

    gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccugcagac 60
    gacucgcccg a                                     71

```

30 <210> 19

<211> 71

<212> ARN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

<220>

40 <221> modified\_base

<222> (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

45 <400> 19

```

    gggaggacga ugcgguuaag ucucggguuga augcccaucc cagauccecc ugacccagac 60
    gacucgcccg a                                     71

```

50 <210> 20

<211> 71

<212> ARN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(71)

65 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.

# ES 2 310 989 T3

<400> 20

5                    **gggaggacga ugcggauggc aagucgaacc aucccccacg cuucuccugu uccccagac 60**  
                      **gacucgccccg a** 71

<210> 21  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 15 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 20 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.

<400> 21

25                    **gggaggacga ugcgggaagu uuucucugcc uugguuucga uuggcgccuc cccccagac 60**  
                      **gacucgccccg a** 71

<210> 22  
 <211> 71  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 40 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.

<400> 22

45                    **gggaggacga ugcggucgag cggucgaccg ucaacaagaa uaaagcgugu cccugcagac 60**  
                      **gacucgccccg a** 71

<210> 23  
 <211> 71  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 60 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.

<400> 23

65                    **gggaggacga ugcggauggc aagucgaacc aucccccacg cuucuccugu uccccagac 60**  
                      **gacucgccccg a** 71

## ES 2 310 989 T3

<210> 24  
 <211> 76  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 10 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1).. (76)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 15 <400> 24  
 gggaggacga ugcggacuag accgcgaguc cauucaacuu gcccacacaaa aaaccucccc 60  
 20 cagacgacuc gcccgga 76  
 <210> 25  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 30 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 35 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 <400> 25  
 gggaggacga ugcgggagau caacauuccu cuaguuuuggu uccaaccuac acccccagac 60  
 40 gacucgcccg a 71  
 <210> 26  
 <211> 71  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 55 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 <400> 26  
 60 gggaggacga ugcggacgag cgucucauga ucacacuaau ugcucucagu gugcacagac 60  
 gacucgcccg a 71  
 <210> 27  
 65 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

## ES 2 310 989 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

<220>

5 <221> modified\_base

<222> (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

10 <400> 27

**gggaggacga ugcggucgac cucgaaugac ucuccaccua ucuaacauc cccccagac 60**  
**gacucgccccg a 71**

15 <210> 28

<211> 71

<212> ARN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

25 <220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

30 <400> 28

**gggaggacga ugcggucgac cucgaaugac ucuccaccua ucuaacagcc uuccccagac 60**  
**gacucgccccg a 71**

35 <210> 29

<211> 71

40 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

45 <220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(71)

50 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.

<400> 29

55 **gggaggacga ugcggagaac ucauccuaac cgcucuaaca aaucuuugucc gaccgcagac 60**  
**gacucgccccg a 71**

<210> 30

<211> 71

60 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

<220>

<221> modified\_base



## ES 2 310 989 T3

<222> (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

5 <400> 30

**gggaggacga ugcggauaa ucgacaccaa ccaggucccg gaaaucaucc cucugcagac 60**  
**gacucgccccg a 71**

10 <210> 31

<211> 71

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

<220>

20 <221> modified\_base

<222> (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

25 <400> 31

**gggaggacga ugcggaaacc aaccguugac caccuuuucg uuuccggaag guccccagac 60**  
**gacucgccccg a 71**

30

<210> 32

<211> 71

<212> ARN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

<220>

40 <221> modified\_base

<222> (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

45

<400> 32

**gggaggacga ugcggaagcc aaccucuaag ucagccuuuc guuucccacg ccaccagac 60**  
**gacucgccccg a 71**

50

<210> 33

<211> 72

<212> ARN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

60 <220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(72)

65 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.

## ES 2 310 989 T3

<400> 33  
 gggaggacga ugcgggacca acuaaacugu ucgaaagcug gaacaugucc ugacgccaga 60  
 cgacucgccc ga 72

5  
 <210> 34  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 15 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 20  
 <400> 34  
 gggaggacga ugcggaccaa cuaaacuguu cgaaagcugg aacacguccu gacgccagac 60  
 25 gacucgcccg a 71  
 <210> 35  
 <211> 71  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 35 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 40 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 <400> 35  
 gggaggacga ugcggaccaa cuaaacuguu cgaaagcuag aacacgucca gacgccagac 60  
 45 gacucgcccg a 71  
 <210> 36  
 <211> 71  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 60 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 <400> 36  
 65 gggaggacga ugcggaccaa cuaaacuguu cgaaagcugg aacacguccu gacgccagac 60  
 gacucgcccg a 71

## ES 2 310 989 T3

<210> 37  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 10 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 15 <400> 37  
  
**gggaggacga ugcggaccaa cuaaacuguu cgaaagcugg aauacguccu gacgccagac 60**  
 20 **gacucgcccg a 71**  
 <210> 38  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 30 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 35 <400> 38  
  
**gggaggacga ugcggaaguu uagugcucca guuccgacac uccucuacuc agccccagac 60**  
 40 **gacucgcccg a 71**  
 <210> 39  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 50 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 55 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 <400> 39  
  
**gggaggacga ugcggagcca gagccucucu caguucuaca gaacuuaccc acuggcagac 60**  
 60 **gacucgcccg a 71**  
 <210> 40  
 <211> 71  
 65 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

## ES 2 310 989 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 5 <222> (1)..(71)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 <400> 40  
 10  
     **gggaggacga ugcggaccua acucaaucag gaaccaaacc uagcacucuc auggccagac 60**  
     **gacucgcccg a 71**  
 15  
 <210> 41  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 25 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 30 <400> 41  
     **gggaggacga ugcgggagau caacauuccu cuaguuggu uccaaccuac acccccagac 60**  
     **gacucgcccg a 71**  
 35  
 <210> 42  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 45 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(71)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.  
 50 <400> 42  
     **gggaggacga ugcggaucuc gauccuucag cacucauuu cauuccuuuc ugccccagac 60**  
     **gacucgcccg a 71**  
 55  
 <210> 43  
 <211> 71  
 60 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 65 <220>  
 <221> modified\_base

## ES 2 310 989 T3

<222> (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

5 <400> 43

gggaggacga ugcggacgau ccuuuccuua acauuucauc auuucucuug ugccccagac 60  
gacucgcccg a 71

10 <210> 44

<211> 71

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

<220>

20 <221> modified\_base

<222> (1)..(71)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

25 <400> 44

gggaggacga ugcggugacg acaacucgac ugcauauuc acaacuccug ugccccagac 60  
gacucgcccg a 71

30

<210> 45

<211> 72

<212> ARN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

40 <220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(72)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F.

45

<400> 45

gggaggacga ugcggacuag accgcgaguc cauucaacu gcccacaaac cuccccagac 60  
cgacucgccc ga 72

50

<210> 46

<211> 70

55 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

60 <220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(70)

65 <223> Todas las pirimidinas son 2'F.

## ES 2 310 989 T3

<400> 46

5            **gggaggacga ugcgggcgca ucgagcaaca uccgauucgg auuccuccac uccccagac 60**  
              **gacugcccga** 70

<210> 47  
 <211> 50  
 <212> ARN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 15 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(50)  
 20 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; el enlace en las posiciones 50 y 51 es 3'-3'.

<400> 47

25            **gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu** 50

<210> 48  
 <211> 55  
 <212> ARN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 35 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 40 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.

<400> 48

45            **gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug** 55

<210> 49  
 <211> 55  
 <212> ARN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 55 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 60 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 1-3, 5 y 55 son 2'OMe; a en la posición 4 es 2'OMe; el  
              enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.

<400> 49

65            **gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug** 55

## ES 2 310 989 T3

<210> 50  
 <211> 55  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 10 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 15 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 6, 9, 12 y 14 son 2'OMe; las a en las posiciones 7 y 10 son 2'OMe; el enlace en las posiciones es 3'-3'.  
 <400> 50  
 20 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55  
 <210> 51  
 <211> 55  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 30 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 35 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 15 y 22 son 2'OMe; las a en las posiciones 16-17,19-20 y 24 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.  
 <400> 51  
 40 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55  
 <210> 52  
 <211> 55  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 50 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 55 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 38, 41 y 44 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.  
 <400> 52  
 60 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55  
 <210> 53  
 <211> 55  
 65 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

## ES 2 310 989 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 5 <222> (1)..(55)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 39-40,43 y 48 son 2'OMe; las a en las posiciones 36-37 y 41 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.

10 <400> 53  
 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 54  
 15 <211> 55  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 25 <222> (1)..(55)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 1 -3, 5-6, 9, 12, 14-15, 22, 28, 31, 34, 39-40, 43, 48 y 55 son 2'OMe.

30 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 <223> Las a en las posiciones 7, 10, 16-17, 19-20, 24, 36-37 y 41 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.  
 35 <400> 54  
 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

40 <210> 55  
 <211> 55  
 <212> ARN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 50 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 55 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 1-3, 5-6, 9, 12, 14-15, 22, 39-40, 43, 48 y 55 son 2'OMe; las a en las posiciones 4, 7, 10, 16-17,19-20, 24-36-37, 40 son 2'OMe.

<220>  
 <221> modified\_base  
 60 <222> (1)..(55)  
 <223> El enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.  
 <400> 55  
 65 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55



## ES 2 310 989 T3

<210> 56  
 <211> 55  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 10 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 15 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 1-3, 5-6, 15, 22, 39-40, 43, 48 y 55 son 2'OMe; las a en las posiciones 4, 16-17, 19-20, 24, 36-37 y 40 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.  
 <400> 56  
 20 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55  
 <210> 57  
 <211> 55  
 25 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 35 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 1-3, 5, 15, 22, 39-40, 43, 48, y 55 son 2'OMe; las a en las posiciones 4, 7, 16-17, 19-20, 24, 36-37 y 40 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.  
 <400> 57  
 40 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55  
 <210> 58  
 <211> 55  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 55 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 1-3, 5, 9, 15, 22, 39-40, 43, 48 y 55 son 2'OMe; las a en las posiciones 4, 16-17, 19-20, 24, 36-37 y 41 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.  
 <400> 58  
 60 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55  
 <210> 59  
 <211> 55  
 65 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

## ES 2 310 989 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 5 <222> (1) .. (55)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 1 -3, 5, 15, 22, 39-40, 43, 48 y 55 son 2'OMe; las a en las posiciones 4, 10, 16-17, 19-20, 24, 36-37 y 41 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.

10 <400> 59  
 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

15 <210> 60  
 <211> 55  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 25 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 1-3, 5, 12, 14-15, 22, 39-40, 43, 48 y 55 son 2'OMe; las a en las posiciones 4, 16-17, 19-20, 24, 36-37 y 41 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.

30 <400> 60  
 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

35 <210> 61  
 <211> 55  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 45 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)  
 <223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 1-3, 6, 15, 22, 28, 39-40, 43, 48, y 55 son 2'OMe; las a en posiciones 4, 16-17, 19-20, 24, 36-37 y 40 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.

50 <400> 61  
 gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu cccug 55

55 <210> 62  
 <211> 55  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico  
 <220>  
 65 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(55)

## ES 2 310 989 T3

<223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 1-3, 5, 15, 22, 39-40, 43, 48 y 55 son 2'OMe; las a en las posiciones 4, 16-17, 19-20, 27, 36-37 y 40 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.

5 <400> 62

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 63

10 <211> 55

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

<220>

<221> modified\_base

20 <222> (1)..(55)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 1-3, 5, 15, 22, 39-40, 43, 48 y 55 son 2'OMe; las a en las posiciones 4, 16-17, 19-20, 24, 36-37 y 40 son 2'OMe; el enlace en las posiciones 55 y 56 es 3'-3'.

25 <400> 63

gggaggacga ugcggaacaa ugcacucguc gccguaaugg auguuuugcu ccug 55

<210> 64

30 <211> 39

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

<220>

<221> modified\_base

40 <222> (1)..(39)

<223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 2-3, 5-6, 23-24, 27, 32, y 39 son 2'OMe; las a en las posiciones 4, 7, 20-21 y 25 son 2'OMe; N en la posición 10 es (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O).

<220>

45 <221> modified\_base

<222> (1)..(39)

<223> El enlace en las posiciones 39 y 40 es 3'-3'.

50 <400> 64

gggaggacgn cgucgccgua auggauguuu ugcuccug 39

55 <210> 65

<211> 34

<212> ARN

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ácido Nucleico

<220>

65 <221> modified\_base

<222> (1)..(34)

## ES 2 310 989 T3

<223> Todas las pirimidinas son 2'F; las g en las posiciones 2-3, 5-6, 23-24, 27 y 32 son 2'OMe; las a en las posiciones 4, 7, 20-21 y 25 son 2'OMe; N en la posición 10 es (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); el enlace en las posiciones 34 y 35 es 3'-3'.

<400> 65

5

gggaggacgn cgucgccgua auggauguuu ugcu 34

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65