

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 047**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2006** **E 06735059 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013** **EP 1850880**

54 Título: **Productos terapéuticos de aptámeros útiles en el tratamiento de trastornos relacionados con el complemento**

30 Prioridad:

14.02.2005 US 58134

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

18.03.2014

73 Titular/es:

**ARCHEMIX LLC (100.0%)
601 Montgomery Street, Suite 2020
San Francisco, CA 94111, US**

72 Inventor/es:

**BENEDICT, CLAUDE;
EPSTEIN, DAVID;
WILSON, CHARLES;
GRATE, DILARA;
KURZ, JEFFREY;
KURZ, MARKUS;
MCCAULEY, THOMAS GREEN y
ROTTMAN, JAMES**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 449 047 T3

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

DESCRIPCIÓN

Productos terapéuticos de aptámeros útiles en el tratamiento de trastornos relacionados con el complemento

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general al campo de los ácidos nucleicos y más particularmente a aptámeros capaces de unirse con la proteína C5 del sistema del complemento, útiles como productos terapéuticos en y diagnóstico de trastornos relacionados con el complemento cardiacos, inflamatorios y autoinmunitarios, lesión de reperfusión por isquemia y/u otras enfermedades o trastornos en los que está implicada activación del complemento mediada por C5. La invención se refiere además a materiales y métodos para la administración de aptámeros capaces de unirse con la proteína del sistema del complemento C5.

15 **Antecedentes de la invención**

Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que tienen afinidad de unión específica por moléculas mediante interacciones distintas de la formación de pares de bases de Watson-Crick clásica.

Los aptámeros, como péptidos generados por presentación de fagos o anticuerpos monoclonales ("Mab"), son capaces de unirse específicamente con dianas seleccionadas y modular la actividad de la diana, por ejemplo, mediante unión los aptámeros pueden bloquear la capacidad de actuación de su diana. Creados por un procedimiento de selección *in vitro* de grupos de oligonucleótidos de secuencia aleatoria, se han generado aptámeros para más de 100 proteínas incluyendo factores de crecimiento, factores de transcripción, enzimas, inmunoglobulinas y receptores. Un aptámero típico es de 10-15 kDa (30-45 nucleótidos) de tamaño, se une con su diana con afinidad subnanomolar, y diferencia frente a dianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, los aptámeros normalmente no se unirán a otras proteínas de la misma familia génica). Varios estudios estructurales han mostrado que los aptámeros son capaces de usar los mismos tipos de interacciones de unión (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, complementariedad electrostática, contactos hidrófobos, exclusión estérica) que conducen la afinidad y especificidad en complejos de anticuerpo-antígeno.

Los aptámeros tienen varias características deseables para su uso como productos terapéuticos y de diagnóstico incluyendo alta especificidad y afinidad, eficacia biológica, y excelentes propiedades farmacocinéticas. Además, ofrecen ventajas competitivas específicas sobre anticuerpos y otros productos biológicos proteicos, por ejemplo:

35 1) Velocidad y control. Se producen aptámeros por un procedimiento completamente *in vitro*, permitiendo la rápida generación de candidatos iniciales, incluyendo candidatos terapéuticos. La selección *in vitro* permite que la especificidad y afinidad del aptámero estén estrechamente controladas y permite la generación de candidatos, incluyendo candidatos contra dianas tanto tóxicas como no inmunogénicas.

40 2) Toxicidad e inmunogenicidad. Los aptámeros como una clase han demostrado poca o ninguna toxicidad o inmunogenicidad. En la dosificación crónica de ratas o marmotas con altos niveles de aptámero (10 mg/kg diariamente durante 90 días), no se observa toxicidad por ninguna medida clínica, celular o bioquímica. Aunque la eficacia de muchos anticuerpos monoclonales puede limitarse gravemente por la respuesta inmunitaria a los anticuerpos en sí mismos, es extremadamente difícil inducir anticuerpos para aptámeros más probablemente debido a que los aptámeros no pueden presentarse por linfocitos T mediante el MHC y la respuesta inmunitaria generalmente se entrena para no reconocer fragmentos de ácidos nucleicos.

50 3) Administración. Aunque la mayoría de los productos terapéuticos de anticuerpo aprobados en la actualidad se administran por infusión intravenosa (normalmente durante 2-4 horas), pueden administrarse aptámeros por inyección subcutánea (la biodisponibilidad de aptámero mediante administración subcutánea es >80 % en estudios de monos (Tucker *et al.*, J. Chromatography B. 732: 203-212, 1999)). Esta diferencia se debe principalmente a la solubilidad comparativamente baja y por lo tanto graves volúmenes necesarios para la mayoría de los Mab terapéuticos. Con buena solubilidad (>150 mg/ml) y peso molecular comparativamente bajo (aptámero: 10-50 kDa; anticuerpo: 150 kDa), puede suministrarse una dosis semanal de aptámero por inyección en un volumen de menos de 0,5 ml. Además, el tamaño pequeño de los aptámeros les permite penetrar en áreas de restricciones conformacionales que no permiten que penetren anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, presentando otra ventaja más de productos terapéuticos o profilaxis basados en aptámeros.

60 4) Capacidad de cambio de escala y coste. Los aptámeros terapéuticos se sintetizan químicamente y en consecuencia pueden cambiarse de escala fácilmente según se necesite para cumplir las demandas de la producción. Aunque las dificultades del cambio de escala de la producción limitan en la actualidad la disponibilidad de algunos productos biológicos y el coste capital de una planta de producción de proteínas a gran escala es enorme, un único sintetizador de oligonucleótidos a gran escala puede producir más de 100 kg/año y requiere una inversión inicial relativamente modesta. El coste actual de los productos para la síntesis de aptámeros en la escala de kilogramos se estima en 500\$/g, comparable al de anticuerpos altamente optimizados. Se espera que las mejoras continuas en el desarrollo del procedimiento reduzcan el coste de los productos a menos de 100\$/g en cinco años.

5) **Estabilidad.** Los aptámeros terapéuticos son químicamente robustos. Están adaptados de forma intrínseca para reanudar la actividad tras su exposición a factores tales como calor y desnaturalizantes y pueden almacenarse durante periodos prolongados (>1 año) a temperatura ambiente como polvos liofilizados.

5 El sistema del complemento

10 El sistema del complemento comprende un conjunto de al menos 20 proteínas de plasma y de membrana que actúan juntas en un sistema de cascada regulado para atacar formas extracelulares de patógenos (por ejemplo, bacterias). El sistema del complemento incluye dos cascadas de activación enzimática distintas, las rutas clásica y alternativa (Figura 1), y una ruta no enzimática conocida como ruta de ataque de membrana.

15 La primera cascada activada enzimáticamente, conocida como la ruta clásica, comprende varios componentes, C1, C4, C2, C3 y C5 (enumerados por orden en la ruta). El inicio de la ruta clásica del sistema del complemento se produce después de unión y activación del primer componente de complemento (C1) por activadores tanto inmunitarios como no inmunitarios. C1 comprende un complejo dependiente de calcio de componentes C1q, C1r y C1s, y se activa mediante la unión del componente C1q. C1q contiene seis subunidades idénticas y cada subunidad comprende tres cadenas (las cadenas A, B y C). Cada cadena tiene una región de cabeza globular que está conectada con una cola de tipo colágeno. La unión y activación de C1q por complejos de anticuerpo-antígeno se realiza mediante la región de grupos de cabeza C1q. Numerosos activadores de C1q no anticuerpos, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, se unen a y activan C1q mediante un sitio distinto de la región de tallo de tipo colágeno. El complejo de C1qrs cataliza después la activación de los componentes del complemento C4 y C2, formando el complejo C4bC2a que actúa como una C3 convertasa.

25 La segunda cascada activada enzimáticamente, conocida como la ruta alternativa, es una ruta rápida, independiente de anticuerpo, para la activación y amplificación del sistema del complemento. La ruta alternativa comprende varios componentes, C3, Factor B y Factor D (enumerados por orden en la ruta). Se produce activación de la ruta alternativa cuando C3b, una forma de escisión proteolítica de C3, se une con un agente de superficie activador tal como una bacteria. El Factor B se une después con C3b, y se escinde por el Factor D para producir la enzima activa, Ba. La enzima Ba escinde después más C3 para generar más C3b, produciendo deposición extensiva de complejos C3b-Ba en la superficie de activación.

35 Por lo tanto, las rutas del complemento tanto clásica como alternativa producen C3 convertasas que dividen el factor C3 en C3a y C3b. En este punto, ambas C3 convertasas se ensamblan además en C5 convertasas (C4b2a3b y C3b3bBb). Estos complejos escinden posteriormente el componente del complemento C5 en dos componentes: el polipéptido C5a (9 kDa) y el polipéptido C5b (170 kDa). El polipéptido C5a se une a un receptor acoplado a proteína G de 7 transmembranas, que se asoció originalmente con leucocitos y se sabe ahora que se expresa en diversos tejidos incluyendo hepatocitos y neuronas. La molécula C5a es el componente quimiotáctico primario del sistema del complemento humano y puede desencadenar diversas respuestas biológicas incluyendo quimiotaxis de leucocitos, contracción del músculo liso, activación de rutas de transducción de señal intracelulares, adhesión endotelial de neutrófilos, liberación de citocinas y lípidos y formación de oxidantes.

45 El fragmento C5b mayor se une secuencialmente a componentes posteriores de la cascada del complemento, C6, C7, C8 y C9 para formar el complejo de ataque de membrana C5b-9 ("MAC"). El MAC C5b-9 puede lisar directamente eritrocitos, y en mayores cantidades, es lítico para leucocitos y perjudicial para tejidos tales como células musculares, epiteliales y endoteliales. En cantidades sublíticas, el MAC puede estimular la regulación positiva de moléculas de adhesión, aumento de calcio intracelular y liberación de citocinas. Además, el MAC C5b-9 puede estimular células tales como células endoteliales y plaquetas sin provocar lisis celular. Los efectos no líticos de C5a y el MAC C5b-9 son en ocasiones bastante similares.

50 Aunque el sistema del complemento tiene un papel importante en el mantenimiento de la salud, tiene el potencial de provocar o contribuir a enfermedad. Por ejemplo, el sistema del complemento se ha implicado en efectos secundarios relacionados con cirugía de injerto de derivación de las arterias coronarias ("CABG"), numerosas enfermedades y/o afecciones renales, reumatológicas, neurológicas, dermatológicas, hematológicas, vasculares/pulmonares, alérgicas, infecciosas y de biocompatibilidad/choque, y retinopatía diabética. El sistema del complemento no es necesariamente la única causa de una patología, pero puede ser uno de varios factores que contribuyen a la patogénesis.

60 En Fitch *et al.*, *Circ.* 100: 2499-506 (1999), se ensayaron los efectos del fragmento de anticuerpo monocatenario anti C5 Pexelizumab en pacientes que se someten a cirugía de injerto de derivación de arterias coronarias con derivación cardiopulmonar ("CPB"). Se administró a pacientes individuales Pexelizumab en una dosis de embolada individual, de 10 minutos justo antes de CPB a 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg y 2,0 mg/kg. Se retiraron muestras sanguíneas y se ensayaron con respecto a actividad del complemento en predosis, 5 minutos postdosis, después de 5 minutos a 28 °C, después del inicio del precalentamiento, después de 5 minutos a 37 °C y hasta 7 días después del CPB. Los análisis farmacodinámicos demostraron inhibición dependiente de dosis significativa de la actividad hemolítica del complemento durante hasta 14 horas a una dosificación de 2 mg/kg, y la generación de productos secundarios del complemento proinflamatorios (sC5b-9) se inhibió eficazmente de una manera dependiente de dosis. Como se ha

mencionado previamente, sin embargo, los productos terapéuticos de anticuerpo tienen ciertas limitaciones.

El documento WO 99/41271 desvela métodos para identificar y preparar ligandos de Ácido Nucleico de alta afinidad para las Proteínas del Sistema del Complemento C1q, C3 y C5.

En consecuencia, sería beneficioso tener nuevos inhibidores del sistema del complemento para su uso como productos terapéuticos y de diagnóstico en el tratamiento de trastornos relacionados con el complemento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración que representa las rutas alternativa y clásica del sistema del complemento.

La Figura 2 es una presentación esquemática del procedimiento de selección de aptámeros *in vitro* (SELEX™) de grupos de oligonucleótidos de secuencia aleatoria.

La Figura 3A es una ilustración que representa la secuencia de nucleótidos y estructura secundaria de un aptámero anti C5 (SEC ID N°: 1), en la que los restos subrayados son restos de 2'-H pirimidina o restos de 2'-fluoro pirimidina, los restos encuadrados son restos de 2'-fluoro pirimidina o restos de 2'-OMe pirimidina, y los restos indicados por una flecha (→) representan restos que deben contener una modificación de 2'-fluoro.

La Figura 3B es una ilustración que representa la secuencia de nucleótidos y estructura secundaria del aptámero anti C5 ARC330 (SEC ID N°: 2), en el que los restos rodeados son restos 2'-H, los restos de pirimidina son 2'-fluoro sustituidos, y la mayoría de los restos de purina son 2'-OMe sustituidos, excepto por los tres restos de 2'-OH purina mostrados en contorno.

La Figura 3C es una ilustración que representa la secuencia de nucleótidos y estructura secundaria del aptámero anti C5 ARC186 (SEC ID N°: 4) en el que los 21 restos de pirimidina tienen modificaciones 2'-fluoro y la mayoría de las purinas (14 restos) tienen modificaciones 2'-OMe, excepto por los tres restos de 2'-OH purina mostrados en contorno.

La Figura 4 es una ilustración de un PEG (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida)) ramificado de 40 kD.

La Figura 5 es una ilustración de un PEG (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida)) ramificado de 40 kD unido al extremo 5' de un aptámero.

La Figura 6 es una ilustración que representa diversas estrategias para la síntesis de conjugados de ácido nucleico-PEG de alto peso molecular.

La Figura 7A es una gráfica que compara la inhibición dependiente de dosis de hemólisis por aptámeros anti C5 PEGilados (ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC187 (SEC ID N°: 5)), con un aptámero anti C5 no PEGilado (ARC186 (SEC ID N°: 4)); la Figura 7B es una tabla de los valores de Cl_{50} de los aptámeros usados en el ensayo de hemólisis representado en la Figura 7A; la Figura 7C es una gráfica que compara la inhibición dependiente de dosis de la hemólisis de aptámeros anti C5 PEGilados ARC187 (SEC ID N°: 5), ARC1537 (SEC ID N°: 65), ARC1730 (SEC ID N°: 66) y ARC1905 (SEC ID N°: 67); la Figura 7D es una tabla de los valores de Cl_{50} de los aptámeros usados en el ensayo de hemólisis representado en la Figura 7C.

La Figura 8 es una gráfica del porcentaje de inhibición de hemólisis por el aptámero anti C5, ARC658 (SEC ID N°: 62), de complemento de suero de cynomolgus frente a complemento del suero humano.

La Figura 9 es una gráfica que representa la unión de ARC186 (SEC ID N°: 4) con proteína C5 purificada tanto a 37 °C como a temperatura ambiente (23 °C) después de una incubación de 15 minutos.

La Figura 10 es otra gráfica que representa la unión de ARC 186 (SEC ID N°: 4) con proteína C5 purificada tanto a 37 °C como a temperatura ambiente (23 °C) después de una incubación de 4 horas.

La Figura 11 es una gráfica que muestra un ciclo temporal de disociación de complejo C5-ARC186 a 23 °C.

La Figura 12 es una gráfica que muestra un ciclo de tiempo de equilibrio en la formación de complejo C5-ARC186 a 23 °C.

La Figura 13 es una gráfica que representa unión de ARC186 (SEC ID N°: 4) con proteína C5 frente a componentes proteicos corriente arriba y corriente abajo en la cascada del complemento.

La Figura 14 es una gráfica que representa el porcentaje de ARC186 radiomarcado (SEC ID N°: 4) que se unió a C5 en presencia de competidor no marcado ARC186 (SEC ID N°: 4), ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62) o ARC187 (SEC ID N°: 5).

La Figura 15 es una gráfica que representa la cantidad de proteína del complemento C5b producida en muestras sanguíneas incubadas durante 5 horas a 25 °C y 37 °C en presencia de diversas concentraciones del aptámero ARC 186 (SEC ID N°: 4).

5 La Figura 16 es una gráfica que representa el porcentaje de inhibición del complemento por ARC187 (SEC ID N°: 5) en presencia de zimosano en suero humano no diluido, sangre completa humana citratada o suero de cynomolgus.

La Figura 17 es una gráfica que muestra que ARC658 (SEC ID N°: 62) inhibe completamente la activación del complemento (C5a) en el modelo de bucle de intubación descrito en el Ejemplo 1D.

10 La Figura 18 es una gráfica que representa las constantes de disociación para el ciclo 10 de los grupos de selección de C5. Las constantes de disociación (K_d) se estimaron ajustando los datos a la ecuación: fracción de ARN unido = $\text{amplitud} \cdot K_d / (K_d + [C5])$. "ARC520" (SEC ID N°: 70) se refiere al grupo de dRmY no seleccionado no tratado y el "+" indica la presencia de competidor (ARNt 0,1 mg/ml, ADN de esperma de salmón 0,1 mg/ml).

15 La Figura 19 es una gráfica que representa curvas constantes de disociación de clon de C5. Las constantes de disociación (K_d) se estimaron ajustando los datos a la ecuación: fracción de ARN unido = $\text{amplitud} \cdot K_d / (K_d + [C5])$.

20 La Figura 20 es una gráfica que representa una curva de CI_{50} que ilustra el efecto inhibitor en la actividad de hemólisis de diversas concentraciones del clon de aptámero anti C5 ARC913 (SEC ID N°: 75) en comparación con ARC 186 (SEC ID N°: 4).

La Figura 21 es una ilustración que representa la estructura de ARC187 (SEC ID N°: 5).

25 La Figura 22 es una ilustración que representa la estructura de ARC1905 (SEC ID N°: 67).

La Figura 23 es una tabla que perfila el diseño experimental del primer estudio de corazón perfundido aislado.

30 La Figura 24 es una gráfica que compara los rastros de presión para la presión intraventricular en el ventrículo izquierdo (LV) de un corazón aislado expuesto a plasma humano (A) con los rastros de presión de LVP de un corazón aislado expuesto a la solución de aptámero de control (B).

35 La Figura 25 es una gráfica que compara los rastros de presión para la presión intraventricular en el ventrículo izquierdo (LV) de los corazones aislados expuestos a las soluciones de C5/aptámero equivalente molar, 10X y 50X (en las que se asume una concentración de aproximadamente 500 nM para C5 en plasma normal, humano no diluido).

40 La Figura 26 es una gráfica que compara los cambios del ritmo cardiaco en pulsaciones por minuto (bpm) en corazones de ratón aislados después de exposición a plasma humano y diversas soluciones de plasma/aptámero.

La Figura 27 es una gráfica que compara los cambios en el peso cardiaco en corazones de ratón aislados antes y después de la exposición a plasma humano que contiene ARC 186 (SEC ID N°: 4) en relación molar 0-1X (corazones con insuficiencia), o relación molar 10-50X (corazones protegidos con aptámero C5).

45 La Figura 28 es una gráfica que compara la producción de C5a relativa en plasma humano, que contiene diversas concentraciones de aptámero, después de perfusión a través de corazones de ratón aislados. Las concentraciones de C5a relativas se representan como unidades de absorbancia (Ab), en las que las lecturas mayores reflejan la presencia de mayores niveles de C5a.

50 La Figura 29 es una gráfica que compara la producción de C5b-9 soluble relativa en plasma humano que contiene diversas concentraciones de aptámero, después de perfusión a través de corazones de ratón aislados.

La Figura 30 es una gráfica que muestra el efecto de ARC 186 (SEC ID N°: 4) en la escisión de C3 en efluente de corazón de ratón.

55 La Figura 31 es una tabla que muestra los resultados de tinción inmunohistoquímica para el estudio de corazón de ratón perfundido aislado.

60 La Figura 32 es una tabla que muestra la relación molar de ARC658 (SEC ID N°: 62) necesaria, en suero humano o de primate, para proteger el corazón de daño mediado por C5b.

La Figura 33 es una gráfica que muestra una representación logarítmica lineal del porcentaje restante de ARC 186 de longitud completa en función del tiempo de incubación en plasma tanto de rata como de macaco cynomolgus.

65 La Figura 34 es una tabla que muestra el diseño experimental del estudio farmacocinético realizado en ratas Sprague-Dawley como se describe en el Ejemplo 5.

- La Figura 35 es una tabla que muestra la concentración en plasma media de ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62) o ARC187 (SEC ID N°: 5) frente al tiempo en ratas Sprague-Dawley.
- 5 La Figura 36 es una gráfica que representa la concentración en plasma media de ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC187 (SEC ID N°: 5) a lo largo del tiempo después de administración intravenosa de aptámero en ratas.
- La Figura 37 es una tabla que muestra el análisis no compartimental de los datos de concentración frente a tiempo representados en las Figuras 35 y 36.
- 10 La Figura 38A es una tabla que muestra el diseño para el estudio farmacocinético de ARC187 (SEC ID N°: 5) y ARC1905 (SEC ID N°: 67) en ratones; la Figura 38B es una gráfica que representa el perfil farmacocinético de ARC187 (SEC ID N°: 5) y ARC1905 (SEC ID N°: 67) en ratones CD-1 después de una única administración de embolada IV; la Figura 38C es una tabla que muestra el análisis no compartimental de los datos de concentración frente a tiempo representados en la Figura 38B.
- 15 La Figura 39 es una tabla que muestra la detección de los aptámeros enumerados en tejido cardíaco de ratón después de administración intravenosa.
- 20 La Figura 40 es una tabla que muestra el diseño experimental del Estudio 1 de animales, descrito en el Ejemplo 5E.
- La Figura 41 es una tabla que muestra la concentración de aptámero en plasma frente al tiempo después de administración de embolada intravenosa de aptámero a macacos cynomolgus.
- 25 La Figura 42 es una tabla que enumera los parámetros farmacocinéticos para ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC187 (SEC ID N°: 5) administrados por vía intravenosa a macacos cynomolgus en el Estudio 1.
- La Figuras 43(a) y 43(c) son gráficas que representan las concentraciones en plasma de sC5b-9 y C5a a lo largo del tiempo después de administración intravenosa de los aptámeros anti C5 ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62), o ARC187 (SEC ID N°: 5) a macacos cynomolgus; las Figuras 43(b) y 43(d) son gráficas que representan las concentraciones en plasma de sC5b-9 y C5a frente a concentración de aptámeros anti C5, ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62), o ARC187 (SEC ID N°: 5).
- 30 La Figura 44 es una tabla que muestra el diseño experimental del Estudio 2, descrito en el Ejemplo 5F.
- 35 La Figura 45 es una gráfica que muestra la concentración en plasma de aptámero media en diversos puntos temporales después de la administración intravenosa de ARC658 (SEC ID N°: 62) o ARC187 (SEC ID N°: 5) a macacos cynomolgus.
- 40 La Figura 46 es una tabla que muestra el análisis de dos compartimentos de los datos de concentración frente a tiempo después de administración de aptámero por embolada intravenosa a macaco cynomolgus.
- La Figura 47 es una gráfica que representa la concentración de C5b-9 frente a concentración de ARC 187 (SEC ID N°: 5) o ARC658 (SEC ID N°: 62) en presencia de zimosano en plasma de cynomolgus.
- 45 La Figura 48 es una gráfica que representa la concentración de C5a frente a la concentración de ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC658 (SEC ID N°: 62) en presencia de zimosano en plasma de cynomolgus.
- La Figura 49 es una tabla que resume el estudio de PK-PD de ARC187 (SEC ID N°: 5) durante y después de administración por embolada IV más infusión a macacos cynomolgus.
- 50 La Figura 50 es una tabla que resume los parámetros farmacocinéticos para ARC 187 (SEC ID N°: 5) en macacos cynomolgus después de administración por embolada IV.
- 55 La Figura 51 es una gráfica que representa los perfiles farmacocinéticos calculados y medidos reales de ARC187 (SEC ID N°: 5) durante y después de administración por embolada IV más infusión a macacos cynomolgus.
- La Figura 52 es una gráfica que muestra que los niveles en plasma de ARC187 (SEC ID N°: 5) activo permanecen constantes durante y después de administración por embolada IV más infusión a macacos cynomolgus.
- 60 La Figura 53 es una tabla que muestra los requisitos de dosificación de seres humanos predichos para aptámeros anti C5 en cirugía de CABG.
- La Figura 54 es una gráfica que representa que ARC187 (SEC ID N°: 5) no tiene relativamente ningún efecto *in vitro* en la coagulación como se mide por el tiempo de protrombina (PT) y tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT).
- 65

La Figura 55 es una tabla que resume los efectos *in vitro* de ARC187 (SEC ID N°: 5) en la actividad anticoagulación de heparina, y actividad procoagulación de protamina.

5 La Figura 56 es una gráfica que muestra que ARC 187 (SEC ID N°: 5) no afecta a la inversión de anticoagulación de heparina *in vivo*.

La Figura 57 es una gráfica que muestra que ni heparina ni protamina tienen efecto en la función anticomplemento de ARC187 (SEC ID N°: 5), medida por la inhibición de la activación del complemento de zimosano.

10 La Figura 58 es una gráfica que representa el porcentaje de inhibición de la hemólisis de eritrocitos de oveja en presencia de suero humano en función de la concentración de los aptámeros anti C5 ARC1905 (SEC ID N° 67) o ARC672 (SEC ID N° 63).

15 La Figura 59A es una gráfica que representa el porcentaje de inhibición de la hemólisis en presencia de suero humano, de mono cynomolgus y de rata por ARC1905 (SEC ID N° 67); la Figura 59B es una tabla que resume los valores de CI_{50} medios para la inhibición de la activación del complemento en suero humano, de mono cynomolgus y de rata por ARC 1905, un aptámero anti C5 o ARC127, un aptámero irrelevante que no se une con C5 (control negativo).

20 La Figura 60 es una gráfica que representa el valor de CI_{50} para la inhibición de ARC186 (SEC ID N°: 4) radiomarcado (eje vertical) en función de la concentración del competidor no marcado ARC 1905 (SEC ID N° 67) o ARC672 (SEC ID N° 63) (eje horizontal), en un ensayo de unión competitiva.

25 La Figura 61 es una gráfica que representa el valor de CI_{50} para la inhibición de ARC186 (SEC ID N°: 4) radiomarcado (eje vertical) en función de la concentración del competidor no marcado ARC1905 (SEC ID N° 67) (eje horizontal) a 37 °C y 25 °C en un ensayo de unión competitiva.

30 La Figura 62 es una gráfica que representa las curvas patrón para C5a humano (hC5a) y C5a de mono cynomolgus (hC5a eq).

La Figura 63 es una tabla que resumen los valores de CI_{50} , CI_{90} y CI_{99} para la inhibición de la activación de C5 en suero humano y de mono cynomolgus por ARC1905 (SEC ID N° 67), como se mide en un ensayo de activación del complemento inducida por zimosano.

35 La Figura 64 es una gráfica que representa el porcentaje de inhibición de la generación de C5a en función de la concentración de ARC1905 (SEC ID N° 67) en sueros humanos y de mono cynomolgus como se mide en un ensayo de activación del complemento inducida por zimosano.

40 La Figura 65 es una gráfica que representa el efecto de ARC 1905 (SEC ID N° 67) en la generación de C3a en suero humano o de mono cynomolgus, como se mide en un ensayo de activación del complemento inducida por zimosano.

45 La Figura 66 es una tabla que resume los valores de CI_{50} , CI_{90} y CI_{99} medios para la inhibición por ARC1905 de la activación del complemento (SEC ID N° 67) en suero humano de 5 donantes, como se mide en un modelo de bucle de tubos de activación del complemento.

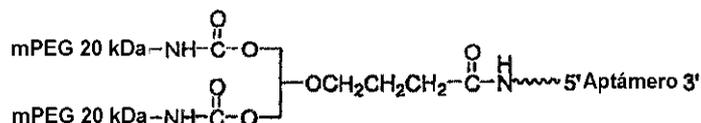
La Figura 67 es una gráfica que representa el porcentaje de inhibición de la generación de C5a y C3a en función de la concentración de ARC1905, un aptámero anti C5, o ARC127, un aptámero irrelevante que no se une con C5 (control negativo) en un modelo de bucle de tubos de la activación del complemento.

50 Sumario de la invención

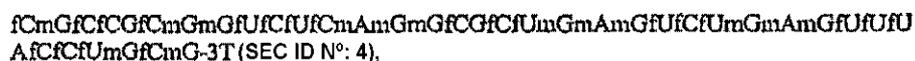
La presente invención proporciona materiales y métodos para el tratamiento, prevención y alivio de enfermedad relacionada con el complemento. En una realización, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con ARC186 (SEC ID N°: 4) conjugada con un resto de PEG. En realizaciones particulares, este conjugado de PEG/aptámero ARC186 comprende sustancialmente la misma afinidad de unión por la proteína del complemento C5 que un aptámero que consiste en la secuencia de acuerdo con SEC ID N°: 4 pero que carece del resto de PEG. Sustancialmente la misma afinidad de unión como se usa en el presente documento significa una diferencia de no más de aproximadamente 2 a 10 veces, preferentemente una diferencia de no más de 2 a 5 veces en las constantes de disociación como se miden por un análisis de transferencia puntual. En algunas realizaciones, las constantes de disociación se miden por análisis de transferencia puntual de competición como se describe en el Ejemplo 1A posterior. El resto de polietilenglicol comprende un peso molecular mayor de 40 kDa. En algunas realizaciones, el resto de PEG se conjuga con el extremo 5' de ARC186 (SEC ID N°:4). En algunas realizaciones, el conjugado de aptámero/PEG comprende una semivida, preferentemente la semivida terminal en un modelo de dos compartimentos como se determina por el método descrito en el Ejemplo 5E posterior, de al menos 15 horas, preferentemente al menos 24 horas, más preferentemente al menos 48 horas en primates. En algunas realizaciones el conjugado de aptámero/PEG comprende una semivida, preferentemente la semivida terminal en un modelo de

dos compartimentos, de al menos 10, preferentemente al menos 15 horas en ratas. El PEG conjugado con el extremo 5' de ARC186 (SEC ID N°: 4) es un PEG de 40 kDa. El PEG de 40 kDa es un PEG ramificado. En algunas realizaciones el PEG de 40 kDa es 1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida). También se describe en el presente documento PEG de 40 kDa ramificado que es 2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo.

En realizaciones en las que el PEG de 40 kDa ramificado es 1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida), se proporciona un aptámero que tiene la estructura expuesta a continuación:

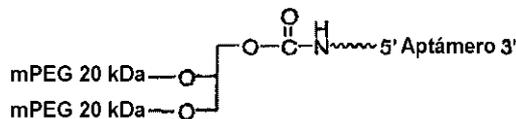


en la que,
 "" indica un adaptador
 Aptámero =

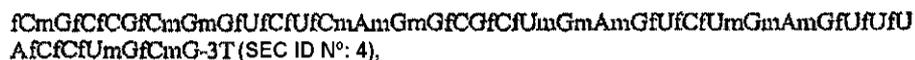


en la que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, y mG y mA = nucleótidos 2'-OMe y todos los otros nucleótidos son 2'-OH y 3T indica una desoxitimidina invertida.

También se describen en el presente documento conjugados en los que el PEG de 40 kDa ramificado es 2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo, en el que se describe un aptámero que tiene la estructura expuesta a continuación:



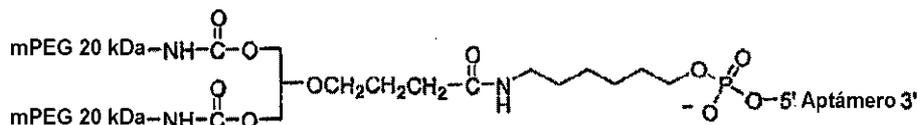
en la que,
 "" indica un adaptador
 Aptámero =



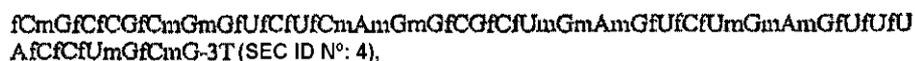
en la que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, y mG y mA = nucleótidos 2'-OMe y todos los otros nucleótidos son 2'-OH y 3T indica una desoxitimidina invertida.

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención el adaptador es un adaptador de alquilo. En realizaciones particulares, el adaptador de alquilo comprende de 2 a 18 grupos de CH₂ consecutivos. En realizaciones preferidas, el adaptador de alquilo comprende de 2 a 12 grupos de CH₂ consecutivos, En realizaciones particularmente preferidas el adaptador de alquilo comprende de 3 a 6 grupos de CH₂ consecutivos.

En una realización particular se proporciona un aptámero, ARC187 (SEC ID N°: 5), que tiene la estructura expuesta a continuación:

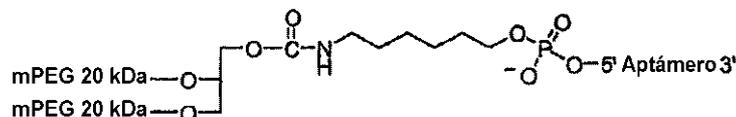


en la que Aptámero =

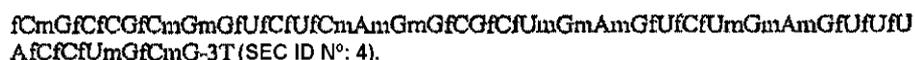


en la que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, y mG y mA = nucleótidos 2'-OMe y todos los otros nucleótidos son 2'-OH y 3T indica una desoxitimidina invertida.

También se describe en el presente documento ARC1905 (SEC ID N°: 67), que tiene la estructura expuesta a continuación:



5 en la que Aptámero =



10 en la que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, y mG y mA = nucleótidos 2'-OMe y todos los otros nucleótidos son 2'-OH y en la que 3T indica desoxitimidina invertida.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas. En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ARC187 (SEC ID N°: 5) o una sal del mismo. La composición farmacéutica de la invención puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En este aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que inhibe la escisión de la proteína del complemento C5 *in vivo* o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En este aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica de ARC187 (SEC ID N°: 5) para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de enfermedad *in vivo*. Además, en este aspecto de la invención se proporciona ARC187 (SEC ID N°: 5) para el uso en la preparación de una composición farmacéutica.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos de tratamiento. En una realización, el método de la invención comprende tratar, prevenir o aliviar una enfermedad mediada por proteína del complemento C5, y/o sus derivados C5a y C5b-9, incluyendo el método administrar una composición farmacéutica que comprende ARC 187 (SEC ID N°: 5) o una sal del mismo a un vertebrado. En algunas realizaciones, el método comprende administrar la composición farmacéutica de la invención a un mamífero. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar es enfermedades isquémicas agudas (infarto de miocardio, ictus, lesión de reperfusión/isquémica); enfermedades inflamatorias agudas (enfermedad infecciosa, septicemia, choque, rechazo de trasplante hiperagudo/agudo); enfermedades inflamatorias crónicas y/o mediadas por sistema inmunitario (alergia, asma, artritis reumatoide y otras enfermedades reumatológicas, esclerosis múltiple y otras enfermedades neurológicas, psoriasis y otras enfermedades dermatológicas, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (LES), rechazo de trasplantes subagudo/crónico, glomerulonefritis y otras enfermedades renales). En algunas realizaciones, las enfermedades mediadas por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar incluyen activación del complemento asociada con diálisis o circunstancias en las que la sangre se pasa sobre y/o a través de tubos sintéticos y/o material ajeno. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar se selecciona del grupo que consiste en lesión miocárdica relacionada con cirugía de CABG, lesión miocárdica relacionada con angioplastia de globo y lesión miocárdica relacionada con reestenosis. En algunas realizaciones, el trastorno mediado por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar se selecciona del grupo que consiste en: lesión miocárdica relacionada con cirugía de CABG, lesión miocárdica relacionada con angioplastia de globo, lesión miocárdica relacionada con reestenosis, complicaciones mediadas por proteína del complemento relacionadas con cirugía de CABG, complicaciones mediadas por proteína del complemento relacionadas con intervención coronaria percutánea, hemoglobinuria nocturna paroxística, rechazo de trasplante agudo, rechazo de trasplante hiperagudo, rechazo de trasplante subagudo y rechazo de trasplante crónico. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar son complicaciones relacionadas con cirugía de CABG. En una realización particular, la enfermedad para tratar es lesión miocárdica relacionada con cirugía de CABG.

En algunas realizaciones, el método de la invención incluye administrar la composición farmacéutica que comprende ARC187 (SEC ID N°: 5) para conseguir una concentración de aptámero en plasma que es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 veces la de la proteína del complemento C5 endógena. En algunas realizaciones, se administran las composiciones farmacéuticas del aptámero ARC187 (SEC ID N°: 5) para conseguir una concentración de aptámero en plasma que es de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 5 veces, de 0,75 a aproximadamente 3 veces, y de 1,5 a aproximadamente 2 veces la de la proteína del complemento C5 endógena mientras que en otras realizaciones la composición del aptámero se administra para conseguir una concentración equivalente a la de la proteína del complemento endógena. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención que comprende ARC 187 (SEC ID N°: 5) se administra para conseguir una concentración de aptámero en plasma de aproximadamente 5 µM, aproximadamente 4 µM, aproximadamente 3 µM, aproximadamente 2 µM, aproximadamente 1,5 µM, aproximadamente 1 µM o de aproximadamente 500 nM.

en la que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, y mG y mA = nucleótidos 2'-OME y todos los otros nucleótidos son 2'-OH y en la que 3T indica una desoxitimidina invertida. El aptámero modificado con amina resultante puede conjugarse con un resto de PEG seleccionado del grupo que consiste en un PEG de 10 kDa, PEG de 20 kDa, PEG de 30 kDa y PEG lineal de 40 kDa. Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 6 a SEC N°: 66, particularmente del grupo que consiste en SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 62 y SEC ID N°: 64 a SEC ID N°: 66 o una sal de las mismas. La composición farmacéutica de la invención puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se describe una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de enfermedad *in vivo*, que comprende un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 6 a SEC N°: 66, particularmente del grupo que consiste en SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 62 y SEC ID N°: 64 a SEC ID N°: 66.

También se proporciona en el presente documento un conjugado de IPEG de aptámero para su uso en un método para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un aptámero o una sal del mismo, en el que aptámero comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 6 a SEC N°: 66, particularmente del grupo que consiste en SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 62 y SEC ID N°: 64 a SEC ID N°: 66 a un vertebrado. En ejemplos descritos en el presente documento, el método comprende administrar la composición farmacéutica de la invención a un mamífero, preferentemente un ser humano.

En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar es enfermedades isquémicas agudas (infarto de miocardio, ictus, lesión de reperfusión/isquémica); enfermedades inflamatorias agudas (enfermedad infecciosa, septicemia, choque, rechazo de trasplante agudo/hiperagudo); enfermedades inflamatorias crónicas y/o mediadas por sistema inmunitario (alergia, asma, artritis reumatoide y otras enfermedades reumatológicas, esclerosis múltiple y otras enfermedades neurológicas, psoriasis y otras enfermedades dermatológicas, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (LES), rechazo de trasplante subagudo/crónico, glomerulonefritis y otras enfermedades renales). En algunas realizaciones, las enfermedades mediadas por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar incluyen activación del complemento asociada con diálisis o circunstancias en las que la sangre se pasa sobre y/o a través de tubos sintéticos y/o material ajeno. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar se selecciona del grupo que consiste en lesión miocárdica relacionada con cirugía de CABG, lesión miocárdica relacionada con angioplastia de globo y lesión miocárdica relacionada con reestenosis. En algunas realizaciones, el trastorno mediado por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar se selecciona del grupo que consiste en: lesión miocárdica relacionada con cirugía de CABG, lesión miocárdica relacionada con angioplastia de globo, lesión miocárdica relacionada con reestenosis, complicaciones mediadas por proteína del complemento relacionadas con cirugía de CABG, complicaciones mediadas por proteína del complemento relacionadas con intervención coronaria percutánea, hemoglobinuria nocturna paroxística, rechazo de trasplante agudo, rechazo de trasplante hiperagudo, rechazo de trasplante subagudo y rechazo de trasplante crónico. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar son complicaciones relacionadas con cirugía de CABG. En una realización particular, la enfermedad para tratar es lesión miocárdica relacionada con cirugía de CABG.

Se describe un método que incluye administrar la composición farmacéutica que comprende un aptámero que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 6 a SEC N°: 66, particularmente del grupo que consiste en SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 62 y SEC ID N°: 64 a SEC ID N°: 66, a un paciente para conseguir una concentración en plasma de aptámero que es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 veces la de la proteína del complemento C5 endógena. Las composiciones de aptámero farmacéuticas se administran para conseguir una concentración en plasma de aptámero que es de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 5 veces, de 0,75 a aproximadamente 3 veces y de 1,5 a aproximadamente 2 veces la de la proteína del complemento C5 endógena mientras que en otras realizaciones la composición de aptámeros se administra para conseguir una concentración equivalente a la de la proteína del complemento endógena. La composición farmacéutica se administra para conseguir una concentración en plasma de aptámero de aproximadamente 5 μ M, aproximadamente 4 μ M, aproximadamente 3 μ M, aproximadamente 2 μ M, aproximadamente 1,5 μ M, aproximadamente 1 μ M o de aproximadamente 500 nM.

Puede usarse cualquier combinación de vía, duración y tasa de administración que sea suficiente para conseguir las concentraciones en plasma de aptámero de la invención. En algunas realizaciones la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra como una embolada y/o mediante infusión continua.

En realizaciones particulares del tratamiento, prevención y/o alivio de complicaciones relacionadas con la cirugía de CABG, particularmente lesión miocárdica relacionada con cirugía de CABG, el método de la invención comprende administrar la composición farmacéutica antes de la cirugía y continuar la administración al menos 24 horas, en algunas realizaciones aproximadamente 48 horas o en algunas realizaciones aproximadamente 72 horas. En una realización particular de este aspecto de la invención, la concentración en plasma de aptámero deseada, por

ejemplo, dos veces la concentración de proteína de complemento endógena en algunas realizaciones, se consigue mediante la administración de una embolada intravenosa al paciente para tratar antes de, simultáneamente con o después de infusión intravenosa de una dosis menor de aptámero. En otras realizaciones más de este aspecto de la invención, en las que el aptámero/conjugado comprende una semivida suficientemente larga, la composición farmacéutica de aptámero puede administrarse una vez o dos veces al día como una dosis de embolada intravenosa.

Se desvelan métodos de diagnóstico descritos en el presente documento. Los métodos de diagnóstico comprenden poner en contacto una composición que se sospecha que comprende proteína del complemento C5 o una variante de la misma con un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 6 a SEC ID N° 66, particularmente del grupo que consiste en SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 62 y SEC ID N°: 64 a SEC ID N°: 66, y detectar la presencia o ausencia de proteína del complemento C5 o una variante de la misma. La proteína del complemento o variante es de vertebrado, particularmente mamífero, y más particularmente humana. Se describe en el presente documento una composición de aptámero que tiene un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 6 a SEC ID N° 66 para su uso como un diagnóstico *in vitro* o *in vivo*. Se describe un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 6 a SEC ID N° 66 para su uso en la preparación de una composición farmacéutica.

Se describe un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que es 80 % idéntica a una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98. Se desvela un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que es 80 % idéntica a la región única de una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 75 a 81 y SEC ID N°: 88 a 98. Se desvela un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que es 90 % idéntica a una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98. Se desvela un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que es 90 % idéntica a la región única de una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 75 a 81 y SEC ID N°: 88 a 98. Se desvela un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos de 40 nucleótidos contiguos idénticos a 40 nucleótidos contiguos incluidos en una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 75 a 81 y SEC ID N°: 88 a 98. Se desvela un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos de 30 nucleótidos contiguos idénticos a 30 nucleótidos contiguos incluidos en una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98. Se desvela un aptámero que se une específicamente a proteína de complemento C5 que comprende una secuencia de nucleótidos de 10 nucleótidos contiguos idénticos a 10 nucleótidos contiguos incluidos en una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98. Se desvela un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98.

Los ejemplos descritos en el presente documento inmediatamente antes pueden comprender además una modificación química seleccionada del grupo que consiste en: una sustitución química en una posición de azúcar; una sustitución química en una posición de fosfato; y una sustitución química en una posición de base de la secuencia de ácido nucleico. La modificación se selecciona del grupo que consiste en: incorporación de un nucleótido modificado; recubrimiento 3', conjugación con un compuesto no inmunogénico, de alto peso molecular; conjugación con un compuesto lipófilo; y modificación de la cadena principal de fosfato.

En realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, el aptámero modula una función de una proteína del complemento C5 o una variante de la misma. En realizaciones particularmente preferidas, el aptámero inhibe una función de la proteína del complemento C5 o una variante de la misma, preferentemente *in vivo*, más preferentemente *in vivo* en seres humanos. En una realización de este aspecto de la invención, la función modulada, preferentemente inhibida, por el aptámero es escisión de proteína del complemento C5.

En algunas realizaciones de otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que bloquea la escisión de proteína del complemento C5 *in vivo* o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos 80 % idéntica a, preferentemente 90 % idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98 o una sal del mismo. Se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos 80 % idéntica a, preferentemente 90 % idéntica a la región única de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98 o una sal del mismo. Se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que tiene 40, 30 o 10 nucleótidos contiguos idénticos a 40, 30 o 10 nucleótidos, respectivamente, para una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98. Los ejemplos descritos en el presente documento pueden comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se describe una composición farmacéutica para

- 5 su uso en el tratamiento, prevención o alivio de enfermedad *in vivo*, en la que la composición farmacéutica comprende un aptámero que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 3 a 4, SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98 o una sal del mismo. Se describe un aptámero que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 3 a 4, SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98 para su uso en la preparación de una composición farmacéutica. Se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que inhibe la escisión de la proteína del complemento C5 *in vivo* o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 10 En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar es enfermedades isquémicas agudas (infarto de miocardio, ictus, lesión de reperfusión/isquémica); enfermedades inflamatorias agudas (enfermedad infecciosa, septicemia, choque, rechazo de trasplantes agudo/hiperagudo); enfermedades inflamatorias crónicas y/o mediadas por el sistema inmunitario (alergia, asma, artritis reumatoide y otras enfermedades reumatológicas, esclerosis múltiple y otras enfermedades neurológicas, psoriasis y otras enfermedades dermatológicas, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (LES), rechazo de trasplantes crónico/subagudo, glomerulonefritis y otras enfermedades renales). En algunas realizaciones, las enfermedades mediadas por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar incluyen activación del complemento asociada con diálisis o circunstancias en las que la sangre se pasa sobre y/o a través de tubos sintéticos y/o material ajeno. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para crear se selecciona del grupo que consiste en lesión miocárdica relacionada con cirugía de CABG, lesión miocárdica relacionada con angioplastia de globo y lesión miocárdica relacionada con reestenosis. En algunas realizaciones, el trastorno mediado por proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar se selecciona del grupo que consiste en: lesión miocárdica relacionada con cirugía de CABG, lesión miocárdica relacionada con angioplastia de globo, lesión miocárdica relacionada con reestenosis, complicaciones mediadas por proteína del complemento relacionadas con cirugía de CABG, complicaciones mediadas por proteína del complemento relacionadas con intervención coronaria percutánea, hemoglobinuria nocturna paroxística, rechazo de trasplante agudo, rechazo de trasplante hiperagudo, rechazo de trasplante subagudo y rechazo de trasplante crónico. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por proteína de complemento C5, C5a y/o C5b-9 para tratar es complicaciones relacionadas con cirugía de CABG. En una realización particular, la enfermedad para tratar es lesión miocárdica relacionada con cirugía de CABG.
- 20 Un método descrito en el presente documento incluye administrar la composición farmacéutica que comprende un aptámero que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 3 a 4, SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98, a un paciente para conseguir una concentración en plasma de aptámero que es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 veces la de la proteína del complemento C5 endógena. Las composiciones farmacéuticas de aptámero se administran para conseguir una concentración en plasma de aptámero que es de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 5 veces, de 0,75 a aproximadamente 3 veces y de 1,5 a aproximadamente 2 veces la de la proteína del complemento C5 endógena mientras que en otros ejemplos descritos en el presente documento la composición de aptámero se administra para conseguir una concentración equivalente a la de la proteína del complemento endógena. La composición farmacéutica se administra para conseguir una concentración en plasma de aptámero de aproximadamente 5 μM , aproximadamente 4 μM , aproximadamente 3 μM , aproximadamente 2 μM , aproximadamente 1,5 μM , aproximadamente 1 μM o de aproximadamente 500 nM.
- 35 Puede usarse cualquier combinación de vía, duración y tasa de administración que sea suficiente para conseguir las concentraciones en plasma de aptámero de la invención. En algunas realizaciones la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra como una embolada y/o mediante infusión continua.
- 40 En realizaciones particulares del tratamiento, prevención y/o alivio de complicaciones relacionadas con cirugía de CABG, particularmente lesión miocárdica relacionada con cirugía de CABG, el método de la invención comprende administrar la composición farmacéutica antes de cirugía y continuar la administración al menos 24 horas, en algunas realizaciones aproximadamente 48 horas o en algunas realizaciones aproximadamente 72 horas. En una realización particular de este aspecto de la invención, la concentración en plasma de aptámero deseada, por ejemplo, dos veces la concentración de proteína del complemento endógena en algunas realizaciones, se consigue mediante administración de una embolada intravenosa al paciente para tratar antes de, simultáneamente con o después de infusión intravenosa de una dosis menor de aptámero. En otras realizaciones más de este aspecto de la invención, cuando el aptámero/conjugado comprende una semivida suficientemente larga, la composición farmacéutica de aptámero puede administrarse una vez o dos veces al día como una dosis de embolada intravenosa.
- 50 Se describe un método de diagnóstico, comprendiendo el método poner en contacto una composición que se sospecha que comprende proteína del complemento C5 o una variante de la misma con un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98 y detectar la presencia o ausencia de proteína del complemento C5 o una variante de la misma. La proteína del complemento o variante descrita en el presente documento es de vertebrado,
- 65

particularmente mamífero, y más particularmente humana. Una composición de aptámero que tiene un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 75 a 81, SEC ID N°: 83 y SEC ID N°: 88 a 98 se describe para su uso como un diagnóstico *in vitro* o *in vivo*.

5 Se desvela un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 68 y 69. Se desvela un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 68 y 69. Los aptámeros descritos en el presente documento pueden usarse en un método de diagnóstico.

10

Descripción detallada de la invención

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta posterior. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción. En la memoria descriptiva, las formas singulares también incluyen el plural a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva tendrá prioridad.

El método de SELEX™

25 Un método adecuado para generar un aptámero es con el procedimiento titulado "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial" ("SELEX™") representado de forma general en la Figura 2. El procedimiento SELEX™ es un método para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica con moléculas diana y se describe, por ejemplo, en 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 documento WO 91/19813) titulada "Ligandos de Ácido Nucleico". Cada ligando de ácido nucleico identificado por SELEX™, es decir, cada aptámero, es un ligando específico de un compuesto o molécula diana dado. El procedimiento de SELEX™ se basa en la percepción única de que los ácidos nucleicos tienen suficiente capacidad para formar diversas estructuras bi y tridimensionales y suficiente versatilidad química disponible dentro de sus monómeros para actuar como ligandos (es decir, formar pares de unión específicos) con prácticamente cualquier compuesto químico, bien monomérico o bien polimérico. Pueden actuar como dianas moléculas de cualquier tamaño o composición.

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

50 Los oligonucleótidos del grupo preferentemente incluyen una parte de secuencia aleatoria así como secuencias fijas necesarias para amplificación eficaz. Normalmente los oligonucleótidos del grupo de partida contienen secuencias 5' y 3' terminales fijas que flanquean una región interna de 30-50 nucleótidos aleatorios. Los nucleótidos aleatorios pueden producirse de varias maneras incluyendo síntesis química y selección de tamaño de ácidos nucleicos celulares escindidos de forma aleatoria. También puede introducirse variación de secuencia en ácidos nucleicos de ensayo o aumentarse por mutagénesis antes o durante las iteraciones de selección/amplificación.

60 La parte de secuencia aleatoria del oligonucleótido puede ser de cualquier longitud y puede comprender ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos y puede incluir nucleótidos o análogos de nucleótidos modificados o no naturales. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.958.691; Patente de Estados Unidos N° 5.660.985; Patente de Estados Unidos N° 5.958.691; Patente de Estados Unidos N° 5.698.687; Patente de Estados Unidos N° 5.817.635; Patente de Estados Unidos N° 5.672.695 y Publicación de PCT WO 92/07065. Pueden sintetizarse oligonucleótidos aleatorios a partir de nucleótidos enlazados por fosfodiéster usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos de fase sólida bien conocidas en este campo. Véase, por ejemplo, Froehler *et al.*, Nucl. Acid Res. 14: 5399-5467 (1986) y Froehler *et al.*, Tet. Lett. 27: 5575-5578 (1986). Los oligonucleótidos aleatorios también pueden sintetizarse usando métodos de fase de solución tales como métodos de síntesis de triéster. Véase, por ejemplo, Sood *et al.*, Nucl. Acid Res. 4: 2557 (1977) y Hirose *et al.*, Tet. Lett., 28: 2449 (1978). Síntesis típicas

65

llevadas a cabo en equipamiento de síntesis de ADN automático producen 10^{14} - 10^{16} moléculas individuales, un número suficiente para la mayoría de experimentos de SELEX™. Regiones suficientemente grandes de secuencia aleatoria en el diseño de secuencia aumentan la probabilidad de que cada molécula sintetizada probablemente represente una secuencia única.

La biblioteca de partida de oligonucleótidos puede generarse por síntesis química automática en un sintetizador de ADN. Para sintetizar secuencias aleatorias, se añaden mezclas de los cuatro nucleótidos en cada etapa de adición de nucleótidos durante el proceso de síntesis, permitiendo la incorporación aleatoria de nucleótidos. Como se ha indicado anteriormente, en una realización, los oligonucleótidos aleatorios comprenden secuencias completamente aleatorias; sin embargo, en otras realizaciones, los oligonucleótidos aleatorios pueden comprender tramos de secuencias no aleatorias o parcialmente aleatorias. Pueden crearse secuencias parcialmente aleatorias añadiendo los cuatro nucleótidos en diferentes relaciones molares en cada etapa de adición.

La biblioteca de partida de oligonucleótidos puede ser ARN o ADN. En los casos en los que vaya a usarse una biblioteca de ARN como una biblioteca de partida normalmente se genera transcribiendo una biblioteca de ADN *in vitro* usando ARN polimerasa T7 o ARN polimerasa T7 modificada y se purifica. La biblioteca de ARN o ADN se mezcla después con la diana en condiciones favorables para unión y se somete a iteraciones por etapas de unión, partición y amplificación, usando el mismo esquema de selección general, para conseguir prácticamente cualquier criterio deseado de afinidad y selectividad de unión. Más específicamente, comenzando con una mezcla que contiene el grupo de partida de ácidos nucleicos, el método de SELEX™ incluye las etapas de: (a) poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para unión; (b) separar ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido específicamente con moléculas diana; (c) disociar los complejos de diana-ácido nucleico; (d) amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos de diana-ácido nucleico para producir una mezcla enriquecida con ligando de ácidos nucleicos, y (e) repetir las etapas de unión, partición, disociación y amplificación durante tantos ciclos como se desee para producir ligandos de ácido nucleico altamente específicos, de alta afinidad para la molécula diana. En los casos en los que se seleccionen aptámeros de ARN, el método de SELEX™ comprende además las etapas de: (i) transcribir de forma inversa los ácidos nucleicos disociados de los complejos de diana-ácido nucleico antes de la amplificación en la etapa (d); y (ii) transcribir los ácidos nucleicos amplificados de la etapa (d) antes de reiniciar el procedimiento.

Dentro de una mezcla de ácido nucleico que contiene un gran número de posibles secuencias y estructuras, hay una amplia serie de afinidades de unión para una diana dada. Una mezcla de ácido nucleico que comprende, por ejemplo, un segmento aleatorio de 20 nucleótidos puede tener 4^{20} posibilidades de candidatos. Los que tienen las mayores constantes de afinidad para la diana es más probable que se unan a la diana. Después de la partición, disociación y amplificación, se genera una segunda mezcla de ácido nucleico, enriquecida para los candidatos de mayor afinidad de unión. Las rondas adicionales de selección favorecen progresivamente los mejores ligandos hasta que la mezcla de ácido nucleico resultante se compone predominantemente de solamente una o algunas secuencias. Estas pueden después clonarse, secuenciarse y ensayarse individualmente con respecto a afinidad de unión como ligandos puros o aptámeros.

Se repiten ciclos de selección y amplificación hasta que se consiga un objetivo deseado. En el caso más general, se continúa la selección/amplificación hasta que no se consigue mejora significativa en la fuerza de unión al repetir el ciclo. El método se usa normalmente para explorar aproximadamente 10^{14} especies de ácido nucleico diferentes pero puede usarse para explorar hasta aproximadamente 10^{18} especies de ácido nucleico diferentes. Generalmente, se seleccionan moléculas de aptámero de ácido nucleico en un procedimiento de 5 a 20 ciclos. En una realización, se introduce heterogeneidad solamente en los estadios de selección iniciales y no aparece durante el procedimiento de replicación.

En una realización de SELEX™, el procedimiento de selección es tan eficaz al aislar los ligandos de ácido nucleico que se unen con más fuerza a la diana seleccionada, que solamente se requiere un ciclo de selección y amplificación. Dicha selección eficaz puede producirse, por ejemplo, en un procedimiento de tipo cromatográfico en el que la capacidad de los ácidos nucleicos para asociarse con las dianas unidas en una columna actúa de tal manera que la columna es suficientemente capaz de permitir la separación y aislamiento de los ligandos de ácido nucleico con mayor afinidad.

En muchos casos, no es necesariamente deseable realizar las etapas por iteraciones de SELEX™ hasta que se ha identificado un único ligando de ácido nucleico. La solución de ligando de ácido nucleico específica de diana puede incluir una familia de estructuras o motivos de ácidos nucleicos que tienen varias secuencias conservadas y varias secuencias que pueden sustituirse o añadirse sin afectar significativamente a la afinidad de los ligandos de ácido nucleico por la diana. Terminando el procedimiento de SELEX™ antes de completarse, es posible determinar la secuencia de varios miembros de la familia de solución de ligando de ácido nucleico.

Se sabe que existen diversas estructuras primarias, secundarias y terciarias de ácido nucleico. Las estructuras o motivos que se ha mostrado que están implicados más habitualmente en interacciones no de tipo Watson-Crick se denominan bucles en horquilla, abultamientos simétricos y asimétricos, seudonudos y multitud de combinaciones de los mismos. Casi todos los casos conocidos de dichos motivos sugieren que pueden formarse en una secuencia de

ácido nucleico de no más de 30 nucleótidos. Por esta razón, con frecuencia se prefiere que los procedimientos de SELEX™ con segmentos aleatorios contiguos se inicien con secuencias de ácido nucleico que contengan un segmento aleatorio de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 nucleótidos y en algunas realizaciones de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 nucleótidos. En un ejemplo, la secuencia 5' fija:aleatoria:3' fija comprende una secuencia aleatoria de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 nucleótidos.

El método de SELEX™ principal se ha modificado para conseguir varios objetivos específicos. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.707.796 describe el uso de SELEX™ junto con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas, tales como ADN plegado. La Patente de Estados Unidos N° 5.763.177 describe métodos basados en SELEX™ para seleccionar ligandos de ácido nucleico que contienen grupos fotorreactivos capaces de unirse y/o fotorreticular con y/o fotoactivar una molécula diana. La Patente de Estados Unidos N° 5.567.588 y Patente de Estados Unidos N° 5.861.254 describen métodos basados en SELEX™ que consiguen partición altamente eficaz entre oligonucleótidos que tienen afinidad alta y baja por una molécula diana. La Patente de Estados Unidos N° 5.496.938 describe métodos para obtener ligandos de ácido nucleico mejorados después de haberse realizado el procedimiento de SELEX™. La Patente de Estados Unidos N° 5.705.337 describe métodos para unir covalentemente un ligando con su diana.

SELEX™ también puede usarse para obtener ligandos de ácido nucleico que se unan a más de un sitio en la molécula diana, y para obtener ligandos de ácido nucleico que incluyan especies no de ácido nucleico que se unan con sitios específicos en la diana. SELEX™ proporciona medios para aislar e identificar ligandos de ácido nucleico que se unan con cualquier diana concebible, incluyendo biomoléculas grandes y pequeñas tales como proteínas de unión a ácido nucleico y proteínas que no se sabe que se unan a ácidos nucleicos como parte de su función biológica así como cofactores y otras moléculas pequeñas. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.580.737 desvela secuencias de ácido nucleico identificadas mediante SELEX™ que son capaces de unirse con alta afinidad a cafeína y el análogo estrechamente relacionado, teofilina.

El contra SELEX™ es un método para mejorar la especificidad de ligandos de ácido nucleico por una molécula diana eliminando secuencias de ligando de ácido nucleico con reactividad cruzada para una o más moléculas no diana. El contra SELEX™ comprende las etapas de: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en el que los ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana en relación con la mezcla candidata pueden separarse del resto de la mezcla candidata; (c) separar los ácidos nucleicos con afinidad aumentada del resto de la mezcla candidata; (d) disociar los ácidos nucleicos de afinidad aumentada de la diana; e) poner en contacto los ácidos nucleicos de afinidad aumentada con una o más moléculas no diana de modo que se retiren los ligandos de ácido nucleico con afinidad específica por la molécula o las moléculas no diana; y f) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad específica solamente por la molécula diana para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecidos con respecto a secuencias de ácido nucleico con una afinidad y especificidad relativamente mayores para unión con la molécula diana. Como se ha descrito anteriormente para SELEX™, se repiten ciclos de selección y amplificación según sea necesario hasta conseguirse un objetivo deseado.

Otro problema potencial encontrado en el uso de ácidos nucleicos como productos terapéuticos y vacunas es que los oligonucleótidos en su forma fosfodiéster pueden degradarse rápidamente en líquidos corporales por enzimas intracelulares y extracelulares tales como endonucleasas y exonucleasas antes de que se manifieste el efecto deseado. El método de SELEX™ abarca de este modo la identificación de ligandos de ácido nucleico de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas al ligando, tales como estabilidad *in vivo* mejorada o características de suministro mejoradas. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en la ribosa y/o fosfato y/o posiciones de base. Se describen ligandos de ácido nucleico identificados por SELEX™ que contienen nucleótidos modificados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.660.985, que describe oligonucleótidos que contienen derivados nucleotídicos modificados químicamente en la posición 2' de la ribosa, posición 5 de pirimidinas y posición 8 de purinas, Patente de Estados Unidos N° 5.756.703 que describe oligonucleótidos que contienen diversas pirimidinas modificadas 2' y la Patente de Estados Unidos N° 5.580.737 que describe ligandos de ácido nucleico altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con sustituyentes 2'-amino (2'-NH₂), 2'-fluoro (2'-F) y/o 2'-OMe (2'-OMe).

Las modificaciones de los ligandos de ácido nucleico contempladas en la presente invención incluyen, pero sin limitación, las que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, capacidad de polarización, hidrofobicidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y fluxionalidad para las bases de ligando de ácido nucleico o el ligando de ácido nucleico completo. Las modificaciones para generar poblaciones de oligonucleótidos que sean resistentes a nucleasas también pueden incluir uno o más enlaces internucleotídicos sustitutos, azúcares alterados, bases alteradas o combinaciones de los mismos. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificaciones de azúcares 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-yodouracilo; modificaciones de cadena principal, modificaciones de fosforotioato o alquilfosfato, metilaciones, y combinaciones de pares de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5' tales como recubrimiento terminal.

En una realización, se proporcionan oligonucleótidos en los que el grupo P(O)O está reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), P(O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal") o 3'-amina (-NH-CH₂-CH₂-), en los que cada R o R' es de forma independiente H o alquilo sustituido o no sustituido. Pueden unirse grupos de enlace a nucleótidos adyacentes mediante un enlace -O-, -N- o -S-. No es necesario que todos los enlaces en el oligonucleótido sean idénticos. Como se usa en el presente documento, el término fosfortioato abarca uno o más átomos de oxígeno no enlazantes en un enlace fosfodiéster reemplazado por uno o más átomos de azufre.

En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos comprenden grupos de azúcares modificados, por ejemplo, uno o más de los grupos hidroxilo se reemplaza con halógeno, grupos alifáticos, o funcionalizados como éteres o aminas. En una realización, la posición 2' del resto de furanosa se sustituye por cualquiera de un grupo OMe, O-alquilo, O-alilo, S-alquilo, S-alilo o halo. Se describen métodos de síntesis de azúcares modificados 2', por ejemplo, en Sproat, *et al.*, Nucl. Acid Res. 19: 733-738 (1991); Cotten, *et al.*, Nucl. Acid Res. 19: 2629-2635 (1991); y Hobbs, *et al.*, Biochemistry 12: 5138-5145 (1973). Se conocen otras modificaciones por los expertos en la materia. Dichas modificaciones pueden ser modificaciones de procedimiento pre SELEX™ o modificaciones de procedimiento post SELEX™ (modificación de ligandos previamente identificados no modificados) o pueden realizarse mediante incorporación en el procedimiento de SELEX.

Las modificaciones de procedimiento pre SELEX o las realizadas por incorporación en el procedimiento de SELEX producen ligandos de ácido nucleico tanto con especificidad por su diana de SELEX™ como con estabilidad mejorada, por ejemplo, estabilidad *in vivo*. Las modificaciones de procedimiento post SELEX™ realizadas a ligandos de ácido nucleico pueden dar como resultado estabilidad mejorada, por ejemplo, estabilidad *in vivo* sin afectar de forma adversa a la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico.

El método de SELEX™ abarca 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 y Patente de Estados Unidos Nº 5.683.867. El método de SELEX™ abarca además combinar ligandos de ácido nucleico seleccionados con compuestos de alto peso molecular lipófilos o no inmunogénicos en un complejo de diagnóstico o terapéutico, como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 6.011.020, Patente de Estados Unidos Nº 6.051.698 y Publicación de PCT Nº WO 98/18480. Estas patentes y solicitudes enseñan la combinación de una amplia serie de formas y otras propiedades, con las propiedades de amplificación y replicación eficaces de oligonucleótidos y con las propiedades deseables de otras moléculas.

La identificación de ligandos de ácido nucleico para péptidos flexibles, pequeños, mediante el método de SELEX™ también se ha explorado. Los péptidos pequeños tienen estructuras flexibles y habitualmente existen en solución en un equilibrio de múltiples conformeros, y por lo tanto se creyó inicialmente que las afinidades de unión podrían estar limitadas por la entropía conformacional perdida tras la unión con un péptido flexible. Sin embargo, la viabilidad de identificar ligandos de ácido nucleico para péptidos pequeños en solución se demostró en la Patente de Estados Unidos Nº 5.648.214. En esta patente, se identificaron ligandos de ácido nucleico de ARN de alta afinidad para sustancia P, un péptido de 11 aminoácidos.

Los aptámeros con especificidad y afinidad de unión por la diana o las dianas de la presente invención se seleccionan normalmente por el procedimiento de SELEX™ como se describe en el presente documento. Como parte del procedimiento de SELEX™, las secuencias seleccionadas para unirse con la diana se minimizan después opcionalmente para determinar la secuencia mínima que tiene la afinidad de unión deseada. Las secuencias seleccionadas y/o las secuencias minimizadas se optimizan opcionalmente realizando mutagénesis aleatoria o dirigida de la secuencia para aumentar la afinidad de unión o como alternativa para determinar qué posiciones en las secuencias son esenciales para la actividad de unión.

Adicionalmente, pueden realizarse selecciones con secuencias incorporando nucleótidos modificados para estabilizar las moléculas de aptámero contra degradación *in vivo*.

SELEX™ modificado 2'

Para que un aptámero sea adecuado para su uso como un producto terapéutico, preferentemente es económico de sintetizar, seguro y estable *in vivo*. Los aptámeros de ADN y ARN de tipo silvestre normalmente no son estables *in vivo* debido a su susceptibilidad a degradación por nucleasas. La resistencia a degradación por nucleasas puede aumentarse en gran medida por la incorporación de grupos modificadores en la posición 2'.

Se han incorporado con éxito grupos fluoro y amino en bibliotecas de oligonucleótidos de las que se han seleccionado posteriormente aptámeros. Sin embargo, estas modificaciones aumentan en gran medida el coste de la síntesis del aptámero resultante, y pueden introducir preocupaciones sobre la seguridad en algunos casos debido a la posibilidad de que los nucleótidos modificados pudieran reciclarse en ADN hospedador por degradación de los oligonucleótidos modificados y posterior uso de los nucleótidos como sustratos para la síntesis de ADN.

Los aptámeros que contienen nucleótidos 2'-OMe ("2'-OMe"), como se proporcionan en algunas realizaciones en el presente documento, superan muchos de estos inconvenientes. Los oligonucleótidos que contienen nucleótidos 2'-OMe son resistentes a nucleasa y económicos de sintetizar. Aunque los nucleótidos 2'-OMe son ubicuos en los

sistemas biológicos, las polimerasas naturales no aceptan 2'-O-metil NTP como sustratos en condiciones fisiológicas, por lo tanto no hay preocupaciones sobre la seguridad acerca del reciclaje de nucleótidos 2'-OMe en ADN hospedador. El método de SELEX™ usado para generar aptámeros modificados 2' se describe, por ejemplo, en los documentos US 2004/0197804 A1, y US 2005/0037394 A1, titulado "Method for *in vitro* Selection of 2'-OMe Substituted Nucleic Acids".

La presente invención incluye aptámeros que se unen con y modulan la función de la proteína del complemento C5 que contiene nucleótidos modificados (por ejemplo, nucleótidos que tienen una modificación en la posición 2') para hacer al oligonucleótido más estable que el oligonucleótido no modificado a degradación enzimática y química, así como degradación térmica y física. Aunque hay varios ejemplos de aptámeros que contienen 2'-OMe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Green *et al.*, Current Biology 2, 683-695, 1995) estos se generaron mediante la selección *in vitro* de bibliotecas de transcritos modificados en los que los restos C y U estaban 2'-fluoro (2'-F) sustituidos y los restos A y G eran 2'-OH. Una vez que se hubo identificado las secuencias funcionales se ensayaron después cada resto A y G con respecto a tolerancia a sustitución de 2'-OMe, y se volvió a sintetizar el aptámero que tenía todos los restos A y G que toleraban la sustitución de 2'-OMe como restos 2'-OMe. La mayoría de los restos A y G de los aptámeros generados de esta manera de dos etapas toleran la sustitución con restos 2'-OMe, aunque, de media, aproximadamente el 20 % no. En consecuencia, los aptámeros generados usando este método tienden a contener de dos a cuatro restos de 2'-OH, y como resultado se ven comprometidos la estabilidad y el coste de la síntesis. Incorporando nucleótidos modificados en la reacción de transcripción que genera oligonucleótidos estabilizados usados en grupos de oligonucleótidos de los que se seleccionan aptámeros y enriquecidos por SELEX™ (y/o cualquiera de sus variaciones y mejoras, incluyendo las descritas en el presente documento), los métodos de la presente invención eliminan la necesidad de estabilizar los oligonucleótidos de aptámeros seleccionados (por ejemplo, volviendo a sintetizar los oligonucleótidos de aptámero con nucleótidos modificados).

En una realización, la presente invención proporciona aptámeros que comprenden combinaciones de modificaciones 2'-OH, 2'-F y 2'-OMe de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP. Se describen en el presente documento aptámeros que comprenden combinaciones de modificaciones 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH₂, y 2'-metoxietilo de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP. Se describen en el presente documento aptámeros que comprenden 5^o combinaciones de modificaciones 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH₂ y 2'-metoxietilo de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP.

Se crean aptámeros modificados 2' de la invención usando polimerasas modificadas, por ejemplo, una polimerasa T7 modificada, que tiene una tasa de incorporación de nucleótidos modificados que tienen sustituyentes voluminosos en la posición 2' de furanosa que es mayor que la de polimerasas de tipo silvestre. Por ejemplo, una polimerasa T7 mutante simple (Y639F) en la que el resto de tirosina en la posición 639 se ha cambiado a fenilalanina utiliza fácilmente 2' desoxi, 2' amino-, y 2' fluoro nucleótido trifosfatos (NTP) como sustratos y se ha utilizado ampliamente para sintetizar ARN modificados para diversas aplicaciones. Sin embargo, se ha indicado que esta polimerasa T7 mutante no puede utilizar (es decir, incorporar) fácilmente NTP con sustituyentes 2' voluminosos tales como sustituyentes 2'-OMe o 2'-azido (2'-N₃). Para incorporación de sustituyentes 2' voluminosos, se ha descrito una polimerasa T7 mutante doble (Y639F/H784A) que tiene la histidina en la posición 784 cambiada a un resto de alanina además de la mutación Y639F y se ha usado en circunstancias limitadas para incorporar NTP de pirimidina modificados. Véase Padilla, R. y Sousa, R., Nucleic Acids Res., 2002, 30(24): 138. También se ha descrito una polimerasa T7 mutante simple (H784A) que tiene la histidina en la posición 784 cambiada a un resto de alanina. Padilla *et al.*, Nucleic Acids Research, 2002, 30: 138. En las polimerasas T7 tanto mutante doble Y639F/H784A como mutante simple H784A, el cambio a un resto de aminoácido menor tal como alanina permite la incorporación de sustratos nucleotídicos más voluminosos, por ejemplo, nucleótidos 2'-O metilo sustituidos.

Generalmente, se ha descubierto que en las condiciones desveladas en el presente documento, el mutante simple Y693F puede usarse para la incorporación de todos los NTP 2'-OMe sustituidos excepto GTP y el mutante doble Y639F/H784A puede usarse para la incorporación de todos los NTP 2'-OMe sustituidos incluyendo GTP. Se espera que el mutante simple H784A posea propiedades similares a los mutantes Y639F y Y639F/H784A cuando se use en las condiciones desveladas en el presente documento.

Pueden sintetizarse oligonucleótidos modificados 2' completamente a partir de nucleótidos modificados, o con un subconjunto de nucleótidos modificados. Las modificaciones pueden ser iguales o diferentes. Todos los nucleótidos pueden modificarse, y todos pueden contener la misma modificación. Todos los nucleótidos pueden modificarse, pero contener diferentes modificaciones, por ejemplo, todos los nucleótidos que contienen la misma base pueden tener un tipo de modificación, mientras que los nucleótidos que contienen otras bases pueden tener diferentes tipos de modificación. Todos los nucleótidos de purina pueden tener un tipo de modificación (o no están modificados), mientras que todos los nucleótidos de pirimidina tienen otro tipo diferente de modificación (o no están modificados). De esta manera, se generan transcritos, o grupos de transcritos usando cualquier combinación de modificaciones, incluyendo por ejemplo, ribonucleótidos (2'-OH), desoxirribonucleótidos (2'-desoxi), nucleótidos 2'-F y 2'-OMe. Una mezcla de transcripción que contenga 2'-OMe C y U y 2'-OH A y G se denomina una mezcla "rRmY" y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros "rRmY". Una mezcla de transcripción que contenga desoxi A y G y 2'-OMe U y C se denomina una mezcla "dRmY" y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros "dRmY". Una mezcla de transcripción que contenga 2'-OMe A, C y U y 2'-OH G se denomina una mezcla

“rGmH” y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros “rGmH”. Una mezcla de transcripción que contenga como alternativa 2'-OMe A, C, U y G y 2'-OMe A, U y C y 2'-F G se denomina “mezcla alternante” y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de “mezcla alternante”. Una mezcla de transcripción que contenga 2'-OMe A, U, C y G, donde hasta el 10 % de las G son ribonucleótidos se denomina una mezcla “r/mGmH” y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros “r/mGmH”. Una mezcla de transcripción que contenga 2'-OMe A, U y C y 2'-F G se denomina una mezcla “fGmH” y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros “fGmH”. Una mezcla de transcripción que contenga 2'-OMe A, U y C, y desoxi G se denomina una mezcla “dGmH” y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros “dGmH”. Una mezcla de transcripción que contenga desoxi A y 2'-OMe C, G y U se denomina una mezcla “dAmB” y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros “dAmB”, y una mezcla de transcripción que contenga todos los nucleótidos 2'-OH se denomina una mezcla “rN” y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros “rN” o “rRrY”. Un aptámero “mRmY” es uno que contiene todos los nucleótidos 2'-OMe y habitualmente deriva de un oligonucleótido r/mGmH por reemplazo post SELEX, cuando sea posible, de cualquier 2'-OH G con 2'-OMe G.

Los ejemplos descritos incluyen cualquier combinación de nucleótidos 2'-OH, 2'-desoxi y 2'-OMe. Los ejemplos descritos incluyen cualquier combinación de nucleótidos 2'-desoxi y 2'-OMe. Los ejemplos descritos incluyen cualquier combinación de nucleótidos 2'-desoxi y 2'-OMe en la que las pirimidinas son 2'-OMe (tales como dRmY, mRmY o dGmH).

La incorporación de nucleótidos modificados en los aptámeros de la invención se consigue antes del (pre) procedimiento de selección (por ejemplo, una modificación preprocedimiento SELEX™). Opcionalmente, los aptámeros de la invención en los que se han incorporado nucleótidos modificados por modificación preprocedimiento SELEX™ pueden modificarse adicionalmente por modificación postprocedimiento SELEX™ (es decir, una modificación postprocedimiento SELEX™ después de una modificación pre SELEX™). Las modificaciones preprocedimiento SELEX™ producen ligandos de ácido nucleico modificados con especificidad por la diana de SELEX™ y también estabilidad mejorada *in vivo*. Las modificaciones postprocedimiento SELEX™ es decir, modificación (por ejemplo, truncamiento, delección, sustitución o modificaciones nucleotídicas adicionales de ligandos previamente identificados que tienen nucleótidos incorporados por modificación preprocedimiento SELEX™) pueden dar como resultado una mejora adicional de la estabilidad *in vivo* sin afectar de forma adversa a la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico que tenga nucleótidos incorporados por modificación preprocedimiento SELEX™.

Para generar grupos de transcritos de ARN modificados 2' (por ejemplo, 2'-OMe) en condiciones en las que una polimerasa acepta NTP modificados 2', la polimerasa preferida es el mutante doble Y693F/H784A o el mutante simple Y693F. Otras polimerasas, particularmente las que muestran una alta tolerancia para sustituyentes 2' voluminosos, también pueden usarse en la presente invención. Dichas polimerasas pueden explorarse con respecto a esta capacidad ensayando su capacidad para incorporar nucleótidos modificados en las condiciones de transcripción desveladas en el presente documento.

Se ha determinado que varios factores son importantes para las condiciones de transcripción útiles en los métodos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, se observan aumentos en las producciones de transcrito modificado cuando se incorpora una secuencia líder en el extremo 5' de una secuencia fija en el extremo 5' del molde de transcripción de ADN, de modo que al menos aproximadamente los 6 primeros restos del transcrito resultante sean todos purinas.

Otro factor importante en la obtención de transcritos que incorporen nucleótidos modificados es la presencia o concentración de 2'-OH GTP. La transcripción puede dividirse en dos fases: la primera fase es el inicio, durante el que se añade un NTP al extremo 3'-hidroxilo de GTP (u otra guanosina sustituida) para producir un dinucleótido que después se extiende en aproximadamente 10-12 nucleótidos; la segunda fase es la elongación, durante la cual la transcripción continúa más allá de la adición de los primeros aproximadamente 10-12 nucleótidos. Se ha descubierto que cantidades pequeñas de 2'-OMe GTP añadidas a una mezcla de transcripción que contiene un exceso de 2'-OH GTP, son suficientes para permitir que la polimerasa inicie la transcripción usando 2'-OH GTP, pero una vez que la transcripción entra en la fase de elongación la diferenciación reducida entre 2'-OMe y 2'-OH GTP, y el exceso de 2'-OMe GTP frente a 2'-OH GTP permite la incorporación de principalmente el 2'-OMe GTP.

Otro factor importante en la incorporación de nucleótidos 2'-OMe sustituidos en transcritos es el uso tanto de manganeso como de magnesio divalente en la mezcla de transcripción. Se ha descubierto que diferentes combinaciones de concentraciones de cloruro de magnesio y cloruro de manganeso afectan a las producciones de transcritos de 2'-OMe, siendo la concentración óptima del cloruro de magnesio y manganeso dependiente de la concentración en la mezcla de reacción de transcripción de los NTP que forman complejos con iones metálicos divalentes. Para obtener las mayores producciones de transcritos de OMe 2' sustituidos al máximo (es decir, todos los A, C y U y aproximadamente el 90 % de los nucleótidos G), se prefieren concentraciones de aproximadamente 5 mM de cloruro de magnesio y 1,5 mM de cloruro de manganeso cuando cada NTP está presente a una concentración de 0,5 mM. Cuando la concentración de cada NTP es 1,0 mM, se prefieren concentraciones de aproximadamente 6,5 mM de cloruro de magnesio y 2,0 mM de cloruro de manganeso. Cuando la concentración de cada NTP es 2,0 mM, se prefieren concentraciones de aproximadamente 9,6 mM de cloruro de magnesio y 2,9 mM

80 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH guanosina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina y al menos el 80 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OMe adenosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 90 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH guanosina, al menos el 90 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina, al menos el 90 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina y al menos el 90 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OMe adenosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que el 100 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH guanosina, el 100 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina, el 100 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina y el 100 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH adenosina.

En condiciones de transcripción de r/mGmH de la presente invención, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OMe adenosín trifosfatos, 2'-OMe citidín trifosfatos, 2'-OMe guanosín trifosfatos, 2'-OMe uridín trifosfatos y 2'-OH guanosín trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción r/mGmH de la presente invención comprenden sustancialmente todos 2'-OMe adenosina, 2'-OMe citidina, 2'-OMe guanosina y 2'-OMe uridina, en los que la población de nucleótidos de guanosina tiene un máximo de aproximadamente 10 % de 2'-OMe guanosina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados de r/mGmH resultantes de la presente invención comprenden una secuencia en la que al menos el 80 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OMe adenosina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OMe guanosina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina y no más de aproximadamente el 10 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH guanosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 90 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OMe adenosina, al menos el 90 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina, al menos el 90 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OMe guanosina, al menos el 90 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina y no más de aproximadamente el 10 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH guanosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que el 100 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OMe adenosina, el 100 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina, el 90 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OMe guanosina, y el 100 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina, y no más de aproximadamente el 10 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH guanosina.

En condiciones de transcripción de fGmH de la presente invención, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OMe adenosín trifosfatos, 2'-OMe uridín trifosfatos, 2'-OMe citidín trifosfatos y 2'-F guanosín trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las condiciones de transcripción fGmH de la presente invención comprenden sustancialmente todos 2'-OMe adenosina, 2'-OMe uridina, 2'-OMe citidina y 2'-F guanosina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 80 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OMe adenosina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina y al menos el 80 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-F guanosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 90 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OMe adenosina, al menos el 90 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina, al menos el 90 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina, y al menos el 90 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-F guanosina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que el 100 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OMe adenosina, el 100 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina, el 100 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina y el 100 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-F guanosina.

En condiciones de transcripción dAmB de la presente invención, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-desoxi adenosín trifosfatos, 2'-OMe citidín trifosfatos, 2'-OMe guanosín trifosfatos, y 2'-OMe uridín trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción dAmB de la presente invención comprenden sustancialmente todos 2'-desoxi adenosina, 2'-OMe citidina, 2'-OMe guanosina y 2'-OMe uridina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 80 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-desoxi adenosina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OMe guanosina, y al menos el 80 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 90 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-desoxi adenosina, al menos el 90 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina, al menos el 90 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OMe guanosina y al menos el 90 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina. En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente invención comprenden una secuencia en la que el 100 % de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-desoxi adenosina, el 100 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina, el 100 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OMe guanosina, y el 100 % de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina.

En cada caso, los productos de transcripción pueden usarse después como la biblioteca en el procedimiento de SELEX™ para identificar aptámeros y/o para determinar un motivo conservado de secuencias que tienen especificidad de unión por una diana dada. Las secuencias resultantes ya están estabilizadas, eliminando esta etapa del procedimiento para llegar a una secuencia de aptámero estabilizado y proporcionando un aptámero más altamente estabilizado como resultado. Otra ventaja del procedimiento de SELEX™ 2'-OMe es que las secuencias resultantes probablemente tengan menos nucleótidos 2'-OH requeridos en la secuencia, posiblemente ninguno. En la medida en que permanecen nucleótidos 2'-OH estos pueden retirarse realizando modificaciones post SELEX.

Como se describe posteriormente, pueden obtenerse producciones menores pero aún útiles de transcritos que incorporan completamente nucleótidos sustituidos 2' en condiciones distintas de las condiciones optimizadas descritas anteriormente. Por ejemplo, las variaciones de las condiciones de transcripción anteriores incluyen:

La concentración de tampón HEPES puede variar de 0 a 1 M. La presente invención también contempla el uso de otros agentes tamponantes que tienen una pKa entre 5 y 10 incluyendo, por ejemplo, tris(hidroximetil)aminometano.

La concentración de DTT puede variar de 0 a 400 mM. Los métodos de la presente invención también posibilitan el uso de otros agentes reductores incluyendo, por ejemplo, mercaptoetanol.

La concentración de espermidina y/o espermina puede variar de 0 a 20 mM.

La concentración de PEG-8000 puede variar de 0 a 50 % (p/v). Los métodos de la presente invención también posibilitan el uso de otro polímero hidrófilo incluyendo, por ejemplo, un PEG de otro peso molecular u otros polialquilenglicoles.

La concentración de Triton X-100 puede variar de 0 a 0,1 % (p/v). Los métodos de la presente invención también posibilitan el uso de otros detergentes no iónicos incluyendo, por ejemplo, otros detergentes, incluyendo otros detergentes de Triton-X.

La concentración de MgCl₂ puede variar de 0,5 mM a 50 mM. La concentración de MnCl₂ puede variar de 0,15 mM a 15 mM. Tanto MgCl₂ como MnCl₂ deben estar presentes dentro de los intervalos descritos y en una realización preferida están presentes en una relación de aproximadamente 10 a aproximadamente 3 de MgCl₂:MnCl₂, preferentemente, la relación es de aproximadamente 3-5:1, más preferentemente, la relación es de aproximadamente 3-4:1.

La concentración de 2'-OMe NTP (cada NTP) puede variar de 5 μM a 5 mM.

La concentración de 2'-OH GTP puede variar de 0 μM a 300 μM.

La concentración de 2'-OH GMP puede variar de 0 a 5 mM.

El pH puede variar de pH 6 a pH 9. Los métodos de la presente invención pueden practicarse dentro del intervalo de pH de la actividad de la mayoría de las polimerasas que incorporan nucleótidos modificados. Además, los métodos de la presente invención posibilitan el uso opcional de agentes quelantes en las condiciones de reacción de transcripción incluyendo, por ejemplo, EDTA, EGTA y DTT.

Los aptámeros seleccionados que tienen la mayor afinidad y unión específica como se demuestra por ensayos biológicos como se describe en los ejemplos posteriores son productos terapéuticos adecuados para tratar afecciones en las que la proteína del complemento C5 está implicada en patogénesis.

Aptámeros con afinidad de unión por la proteína del sistema del complemento C5

Aunque el sistema del complemento tiene un papel importante en el mantenimiento de la salud, tiene el potencial de provocar o contribuir a enfermedad. Por lo tanto, es deseable desarrollar inhibidores del sistema del complemento para su uso terapéutico. Es particularmente deseable desarrollar inhibidores de la proteína del complemento C5 debido a que es un componente de las rutas tanto clásica como alternativa de cascadas de activación del complemento (Matis y Rollins (1995) Nature Medicine 1(8): 839-842). En consecuencia, la inhibición de C5 puede evitar el daño mediado por el complemento provocado por una de las rutas. Algunas proteínas del sistema del complemento, tales como C1q y C3, son importantes en los mecanismos de defensa normales contra microorganismos y en la eliminación de componentes inmunitarios y tejido dañado; sin embargo, C5 es relativamente poco importante para estas funciones. Por lo tanto, la función de C5 puede inhibirse durante periodos de tiempo cortos o largos sin comprometer el papel protector del sistema del complemento.

También es deseable un inhibidor de C5 terapéutico debido a que la inhibición de la escisión de C5 evita la generación de dos actividades del complemento potencialmente perjudiciales. En primer lugar, la inhibición de la generación de C5a de la escisión de C5 elimina la principal actividad quimiotáctica y vasoactiva del complemento. En segundo lugar, la inhibición de la generación de C5b de la escisión de C5 bloquea el ensamblaje del complejo de

ataque a membrana C5b-9 citolítico ("MAC"). La inhibición de la escisión de C5 bloquea los efectos tanto de C5a como de C5b en leucocitos y en tejido tal como células endoteliales (Ward (1996) *Am. J. Pathol.* 149: 1079).

Se ha implicado tanto al C5a como al MAC en inflamación aguda y crónica asociada con enfermedad humana, y su papel en patologías se ha confirmado en modelos animales. Se requiere C5a para lesión vascular dependiente de neutrófilos y complemento (Ward (1997) *J. Lab. Clin. Med.* 129: 400; Mulligan *et al.*, (1998) *J. Clin. Invest.* 98: 503), y se asocia con la activación de neutrófilos y plaquetas en choque y en lesión por quemadura (Schmid *et al.*, (1997) *Shock* 8: 119). El MAC media en la lesión muscular en miastenia grave autoinmunitaria aguda (Biesecker y Gomez (1989) *J. Immunol.* 142: 2654), rechazo de órganos en trasplante (Baldwin *et al.*, (1995) *Transplantation* 59: 797; Brauer *et al.*, (1995) *Transplantation* 59: 288; Takahashi *et al.*, (1997) *Immunol. Res.* 16: 273) y lesión renal en glomerulonefritis autoinmunitaria (Biesecker (1981) *J. Exp. Med.* 39: 1779; Nangaku (1997) *Kidney Int.* 52: 1570). Se ha implicado tanto a C5a como al MAC en isquemia miocárdica aguda (Homeister y Lucchesi (1994) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 17), lesión del SNC aguda (Bednar *et al.*, (1997) *J. Neurosurg.* 86: 139) y crónica (Morgan (1997) *Exp. Clin. Immunogenet.* 14: 19), activación de leucocitos durante la circulación extracorpórea (Sun *et al.*, (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 2909; Spycher y Nydegger (1995) *Infusionsther. Transfusionsmed.* 22: 36) y en lesión tisular asociada con enfermedades autoinmunitarias incluyendo artritis y lupus (Wang *et al.*, (1996) *Immunology* 93: 8563).

También se ha implicado a la activación del complemento en retinopatía diabética, y puede componer o iniciar el daño vascular retinal (Zhang *et al.*, (2002) *Diabetes* 51: 3499). Se produce normalmente activación del complemento constitutiva de nivel bajo en el ojo no diabético, demostrado por la presencia de MAC y proteínas reguladoras del complemento en los ojos de ratas no diabéticas, lo que indica que se produce desregulación del complemento en pacientes diabéticos (Sohn *et al.*, (2000) *IOVS* 41: 3492). Además, se ha detectado deposición de C5b-9 en vasos retinales de donantes humanos diabéticos cuando están ausentes de donantes humanos no diabéticos (Zhang *et al.*), se muestra expresión reducida de CD55 y CD59 en retinas diabéticas (Zhang *et al.*) y CD59 glicosilado está presente en orina de pacientes diabéticos, pero no en pacientes no diabéticos (Acosta *et al.*, (2002) *PNAS* 97, 5450-5455). Adicionalmente, se sabe que el sistema vascular y de complemento se activa en diabetes de tipo I. Véase, por ejemplo, Hansen, T. K. *et al.*, *Diabetes*, 53: 1570-1576 (2004). C5a activa las células endoteliales mediante interacción con los sistemas inmunitario y del complemento. Véase, por ejemplo, Albrecht, E. A. *et al.*, *Am J Pathology*, 164: 849-859 (2004). El sistema vascular se activa en enfermedades oculares incluyendo retinopatía diabética. Véase, por ejemplo, Gert, V. B. *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 1104-1108 (2002). El sistema del complemento también se activa en retinopatía diabética. Véase, por ejemplo, Gert, V.B. *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 1104-1108 (2002) y Badouin, C *et al.*, *Am J Ophthalmol*, 105: 383-388 (1988).

En algunas realizaciones, los materiales de la presente invención comprenden un aptámero de ácido nucleico de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud que se une específicamente con la proteína del complemento C5 y que modula funcionalmente, por ejemplo, bloquea, la actividad de la proteína del complemento C5 en ensayos basados en células y/o *in vivo*.

Se exponen en el presente documento aptámeros que son capaces de unirse específicamente y modular la proteína del complemento C5. Estos aptámeros proporcionan una modalidad de baja toxicidad, segura y eficaz para tratar, aliviar y/o prevenir diversas enfermedades o trastornos relacionados con el complemento incluyendo, por ejemplo, trastornos cardíacos relacionados con el complemento (por ejemplo, lesión miocárdica; complicaciones del complemento mediadas por C5 relacionadas con cirugía de injerto de derivación de arterias coronarias (CABG) tales como hemorragia postoperatoria, activación de neutrófilos y leucocitos sistémica, aumento del riesgo de infarto de miocardio y aumento de la disfunción cognitiva; reestenosis; y complicaciones del complemento mediadas por C5 relacionadas con intervención coronaria percutánea), lesión de perfusión por isquemia (por ejemplo, infarto de miocardio, ictus, congelación), trastornos inflamatorios relacionados con el complemento (por ejemplo, asma, artritis, septicemia y rechazo después de trasplante de órganos) y trastornos autoinmunitarios relacionados con el complemento (por ejemplo, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (LES)). Otras indicaciones para las que es deseable la inhibición de C5 incluyen, por ejemplo, inflamación pulmonar (Mulligan *et al.* (1998) *J. Clin. Invest.* 98: 503), activación del complemento extracorpórea (Rinder *et al.* (1995) *J. Clin. Invest.* 96: 1564), activación del complemento mediada por anticuerpo (Biesecker *et al.* (1989) *J. Immunol.* 142: 2654), glomerulonefritis y otras enfermedades renales, indicaciones oculares tales como daño tisular ocular mediado por C5, por ejemplo retinopatía diabética, y hemoglobinuria nocturna paroxística. Estos aptámeros también pueden usarse en diagnóstico.

Estos aptámeros pueden incluir modificaciones como se describen en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, conjugación con compuestos de alto peso molecular o lipófilos (por ejemplo, PEG), incorporación de un resto de recubrimiento terminal, incorporación de nucleótidos modificados y modificaciones en la cadena principal de fosfato.

En una realización de la invención se proporciona un aptámero de origen no natural, aislado, que se une con la proteína del complemento C5. En algunas realizaciones, el aptámero de origen no natural, aislado, tiene una constante de disociación (" K_d ") para la proteína del complemento C5 de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, menos de 50 nM, menos de 1 nM, menos de 500 pM, menos de 100 pM, menos de 50 pM. En algunas realizaciones de la invención, la constante de disociación se determina por valoración de

transferencia puntual como se describe en el Ejemplo 1 posterior.

5 En otra realización, el aptámero de la invención modula una función de la proteína del complemento C5. En otra realización, el aptámero de la invención inhibe una función de C5 mientras que en otra realización el aptámero estimula una función de C5. Una variante de proteína del complemento C5 como se usa en el presente documento abarca variantes que realizan esencialmente la misma función que una función de proteína del complemento C5. Una variante de proteína del complemento C5 preferentemente comprende sustancialmente la misma estructura y en algunas realizaciones comprende el 80 % de identidad de secuencia, más preferentemente el 90 % de identidad de secuencia, y más preferentemente el 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la proteína del complemento C5 que comprende la secuencia de aminoácidos posterior (SEC ID N^o: 102) (citada en Haviland *et al.*, J Immunol. 1 Ene 1991; 146(1): 362-8):

```

1  mgllgilcfl iflgktwgqe qtyvisapki frvgaseniv iqvygyteaf datisiksyp
61  dkkfsysshgh vhlssenfkf nsailtiqpk qlpggqnpvs yvylevsvkh fskkrmpit
121 ydngflfiht dkpvvtpdqs vkvrsvslnd dlkpakretv ltfidpegse vdmveeidhi
181 giisfpdfki psnprygmwt ikakykedfs ttgtayfevk eyvlphfsvs iepyefigy
241 knfknefeiti karyfynkvv teadvyitfg iredlkddqk emmqtamqnt mlingiaqvt
301 fdsetavkel syysledlnn kylyiavtvi estggfseea eipgikyvlv pyklnlvatp
361 lflkpgipyp ikvqvkdald qlvggvpvtl naqtidvnqe tsdlpkskv trvddgvaaf
421 vlnlpsgvtv lefnvktdap dlpeenqare gyraiayssl sqsylyidwt dnhkallvge
481 hlniivtpks pyidkithyn ylilskgkii hfgtrekfsd asyqsinipv tqnmvpsrsl
541 lvyvvtgeq taelvsdsvw lniecekgnq lqvhlspdad ayspggtval nmatgmdswv
601 alaavdsavy gvqrgakkpl ervfqfleks dlgcgaggggl nnavvfhlag ltflltanad
661 dsqendepck eilrprrtlq kkieeiaaky khsvkkccy dgacvndet ceqraarisl
721 gprcikafte ccvvasqlra nishkdmqlg rllhmkllpv skpeirsyfp eswlwevhlv
781 prrkqlqfal pdslltweiq gvgisntgic vadtvkakvf kdvflemnip ysvvrgegiq
841 lkgtvynyrt sgmqfcvkms avegictses pvidhggtsk skcwrqkveg ssshlvtftv
901 lpleighlni nfsletwfgk eilvktlrsv pegvkresys gvtldprgiy gtisrrkefp
961 yripldlvpk teikrilsvk gllvgeilsa vlsqeginil thlpkgsaea elmsvvpvfy
1021 vfhyletgnh wnifhsdpli ekqklkkklk egmlsimsyr nadysysvkw ggsastwlta
1081 falrvlgqvn kyveqnsi cnsllwlvn yqldngsfke nsqyqplkq gtlpvearen
1141 slyltaftvi girkafdicp lvkidtalik adnfllentl paqstftlai sayalsgdk
1201 thpqfrsivs alkrealvkg nppiyrfwkd nlqhkdsavp ntgtarmvet tayalltsln
1261 lkdinyvnpv ikwlseeqry gggfystqdt inaiegltey sllvkqlrls mdidvsykhk
1321 galhnykmt dknflgrpvev llnddlivst gfgsglatvh vttvvhktst seevcsfylk
1381 idtqdieash yrgygnsdyk rivacasykp sreesssgss havmdislpt gisaneedlk
1441 alvegvdqlf tdyqikdghv ilqlnsipss dflcvrfrif elfevgflsp atftvyeyhr
1501 pdkqctmfys tenikiqkvc egaackcvea dggqmgeeld ltisaetrkq tackpeiaya
1561 ykvsitsitv envfvkykat lldiyktgea vaekdseitf ikkvtctnae lvkgrqylim
1621 gkealqikyn fsfryiypld sltwieywr dttcsscqaf lanldefaed iflngc

```

15 En algunas realizaciones de la invención, la identidad de secuencia de las variantes diana se determina usando BLAST como se describe posteriormente. La expresión "identidad de secuencia" en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o proteína, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para máxima correspondencia, como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante inspección visual. Para comparación de secuencia, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, se introducen secuencias de ensayo y referencia en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia si es necesario, y se designan parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula después el porcentaje de identidad de secuencia para la

20

secuencia o las secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados. Puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (véase en general, Ausubel *et al.*, mencionado posteriormente).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia es el algoritmo usado en la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (en lo sucesivo en el presente documento "BLAST"), véase, por ejemplo Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990) y Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 15: 3389-3402 (1997). Está disponible públicamente software para realizar análisis de BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (en lo sucesivo en el presente documento "NCBI"). Los parámetros por defecto usados en la determinación de la identidad de secuencia usando el software disponible de NCBI, por ejemplo, BLASTN (para secuencias de nucleótidos) y BLASTP (para secuencias de aminoácidos) se describen en McGinnis *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 32: W20-W25 (2004).

En otra realización de la invención, el aptámero tiene sustancialmente la misma capacidad para unirse a la proteína del complemento C5 que la de un aptámero que comprende una cualquiera de: SEC ID N° 1-2, 5-67, 75-81, 83 u 88-98. En otra realización de la invención, los aptámeros tienen sustancialmente la misma estructura y capacidad para unirse a la proteína del complemento C5 que la de un aptámero que comprende una cualquiera de: SEC ID N° 1-2, 5-67, 75-81, 83 u 88-98. En otra realización, los aptámeros de la invención se usan como un principio activo en composiciones farmacéuticas. En otra realización, los aptámeros o composiciones que comprenden los aptámeros de la invención se usan para tratar diversas enfermedades o trastornos relacionados con el complemento incluyendo uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en: trastorno cardiacos relacionado con el complemento (por ejemplo, lesión miocárdica; complicaciones del complemento mediadas por C5 relacionadas con injerto de derivación de arterias coronarias (CABG) tales como hemorragia postoperatoria, activación de neutrófilos y leucocitos sistémica, aumento del riesgo de infarto de miocardio y aumento de la disfunción cognitiva; reestenosis; y complicaciones del complemento mediadas por C5 relacionadas con intervención coronaria percutánea), lesión de reperfusión por isquemia (por ejemplo, infarto de miocardio, ictus, congelación), trastornos inflamatorios relacionados con el complemento (por ejemplo, asma, artritis, septicemia y rechazo después de trasplante de órganos) y trastornos autoinmunitarios relacionados con el complemento (por ejemplo, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (LES), inflamación pulmonar, activación del complemento extracorpórea, activación del complemento mediada por anticuerpos e indicaciones oculares tales como daño del tejido ocular mediado por el complemento tal como retinopatía diabética.

En una realización, los aptámeros anti C5 de la invención incluyen una mezcla de nucleótidos modificados 2'-fluoro, nucleótidos modificados 2'-OMe ("2'-OMe") y restos de purina 2'-OH. Se muestra una secuencia genérica descriptiva (SEC ID N°: 1) para un aptámero anti C5 modificado posteriormente en la Tabla 1, y la estructura se muestra en la Figura 3A. La amplia mayoría de purinas (A y G) se han modificado a 2'-OMe, excluyendo dos restos G que permanecen 2'-OH (restos mostrados en contorno). Los restos rodeados representan un subconjunto de pirimidinas que pueden modificarse simultáneamente a 2'-H sin alterar sustancialmente la actividad anti C5 del aptámero (véase ARC330 en la Tabla 1 posterior (SEC ID N°: 2, Figura 3B)). Los restos subrayados mostrados en la Figura 3A representan restos de pirimidina que pueden contener una modificación 2'-fluoro o una 2'-H (pero no 2'-OMe), mientras que los restos encuadrados representan restos de pirimidina que pueden contener una modificación 2'-fluoro o una 2'-OMe (pero no 2'-H). Los restos indicados con una flecha (→) deben contener una modificación 2'-fluoro. Sin una modificación 2'-fluoro en los restos indicados por una flecha (→), se reduce sustancialmente la actividad hemolítica resultante del aptámero resultante. En una realización preferida, un aptámero anti C5 de la invención comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEC ID N°: 1.

Un ejemplo de un aptámero anti C5 de acuerdo con la invención es ARC186 (SEC ID N°: 4) que se muestra en la Figura 3C y se describe en la Patente de Estados Unidos N° de Serie 6.395.888. Los 21 restos de pirimidina de ARC186 tiene modificaciones 2'-fluoro. La mayoría de las purinas (14 restos) tienen modificaciones 2'-OMe, excepto para los tres restos de purina 2'-OH (mostrados en contorno en la Figura 3C). Los aptámeros anti C5 también pueden incluir diferentes mezclas de modificaciones 2'-fluoro y 2'-H. Por ejemplo, otro aptámero anti C5 descrito en el presente documento es el ARC330 (SEC mostrada en la Figura 3B. ARC330 SEC ID N°: 2), contiene siete modificaciones 2'-H (restos rodeados en la Figura 3B), 14 restos de pirimidina con modificaciones 2'-fluoro, 14 restos de purina con modificaciones 2'-OMe, y tres restos de purina 2'-OH (mostrado en contorno en la Figura 3B).

Otras combinaciones de aptámeros que contienen una mezcla de modificaciones 2'-fluoro, modificaciones 2'-OMe, restos de purina 2'-OH, y conjugación con compuestos de alto peso molecular, no inmunogénicos (por ejemplo, PEG) de diverso tamaño, cada uno de los cuales derivó de ARC 186 (SEC ID N°: 4), se describen en la Tabla 1 posterior.

A no ser que se indique de otro modo las secuencias de nucleótidos de la Tabla 1 posterior se enumeran en la dirección 5' a 3'. Para cada una de las secuencias individuales en la Tabla 1, todas las modificaciones de purina o pirimidina 2'-OMe se indican por una "m" que precede al nucleótidos correspondiente; todas las modificaciones de pirimidina 2'-fluoro se indican por una "f" que precede al nucleótido correspondiente; todas las modificaciones desoxi de purina o pirimidina se indican por una "d" que precede al nucleótido correspondiente; y cualquier purina o pirimidina que aparezca sin una "m", "f", o "d" que preceda al nucleótido indica un resto 2'-OH. Además, un "3T" indica una desoxi timidina invertida, "NH" indica una adaptador de hexilamina, "NH₂" indica un grupo terminal de hexilamina, "PEG" indica un grupo de polietilenglicol que tiene el peso molecular indicado, y "biotina" indica un aptámero que tiene biotina conjugada en el extremo 5'.

Tabla 1:

SEC ID N°: 1

X₁X₂fCfCfGfCX₃X₄fUX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁rGX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃fUfUX₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈fCX₂₉

en la que:

X₁=fC o mC

X₂=rG o mG

X₃=rG o mG

X₄=rG o mG

X₅=fC o dC

X₆=fU o dT

X₇=fC o dC

X₈=rA o mA

X₉=rG o mG

X₁₀=rG o mG

X₁₁=fC o dC

X₁₂=fC o mC

X₁₃=fU o mU

X₁₄=rG o mG

X₁₅=rA o mA

X₁₆=rG o mG

X₁₇=fU o dT

X₁₈=fC o dC

X₁₉=fU o dT

X₂₀=rG o mG

X₂₁=rA o mA

X₂₂=rG o mG

X₂₃=fU o dT

X₂₄=rA o mA

X₂₅=fC o dC

X₂₆=fC o dC

X₂₇=fU o dT

X₂₈=rG o mG

X₂₉=rG o mG

ARC330 (SEC ID N°: 2)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmC

ARC185 (SEC ID N°: 3)

GAfCGAfUGfCGGfUfCfUfCAfUGfCGfUfCGAGfUGfUGAGfUfUfUAfCfCfUfUfCGfUfC

ARC186 (SEC ID N°:4)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC187 (SEC ID N°: 5)

PEG 40 kDa-NH-

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

En la que el PEG de 40 kDa ramificado es 3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida)

ARC188 (SEC ID N°: 6)

AGGAfCGAfUGfCGGfUfCfUfCAfUGfCGfUfCGAGfUGfUGAGfUfUfUAfCfCfUfUfCGfUfC

ARC189 (SEC ID N°: 7)

AGfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC250 (SEC ID N°: 8)

GGfCGfCfCGfCGGfUfCfUfCAGGfCGfCfUGAGfUfCfUGAGfUfUfUAfCfCfUfGfCG

ARC296 (SEC ID N°: 9)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC297 (SEC ID N°: 10)

5

mCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGmCmG-3T

ARC331 (SEC ID N°: 11)

dCmGdCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGdCmG

ARC332 (SEC ID N°: 12)

10

dCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC333 (SEC ID N°: 13)

fCmGdCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC334 (SEC ID N°: 14)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGdCmG

ARC411 (SEC ID N°: 15)

15

fCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC412 (SEC ID N°: 16)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGmCmG

ARC413 (SEC ID N°: 17)

20

mCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC414 (SEC ID N°: 18)

mCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGmCmG

ARC415 (SEC ID N°: 19)

fCmGfCdCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

25

ARC416 (SEC ID N°: 20)

fCmGfCfCGdCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC417 (SEC ID N°: 21)

fCmGfCdCfCGdCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC418 (SEC ID N°: 22)

30

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGdCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfGfLfUmGfCmG

ARC419 (SEC ID N°: 23)

fCmCfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC420 (SEC ID N°: 24)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGdCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC421 (SEC ID N°: 25)

35

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGTfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC422 (SEC ID N°: 26)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC423 (SEC ID N°: 27)

40

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC424 (SEC ID N°: 28)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTfCfCfUmGfCmG

ARC425 (SEC ID N°: 29)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC426 (SEC ID N°: 30)

45

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC427 (SEC ID N°: 31)

fCmGfCmCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC428 (SEC ID N°: 32)

50

fCmGfCfCGmCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

- ARC429 (SEC ID N°: 33)
fCmGfCmCGmCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG
- ARC430 (SEC ID N°: 34)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGmCfUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG
- 5 ARC431 (SEC ID N°: 35)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGfCmUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG
- ARC432 (SEC ID N°: 36)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG
- 10 ARC433 (SEC ID N°: 37)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGmUfUfUAfCfCfUmGfCmG
- ARC434 (SEC ID N°: 38)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUmUfUfUAfCfCfUmGfCmG
- ARC435 (SEC ID N°: 39)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUmUAfCfCfUmGfCmG
- 15 ARC436 (SEC ID N°: 40)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGmUmUmUAfCfCfUmGfCmG
- ARC437 (SEC ID N°: 41)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCmUmGfCmG
- ARC438 (SEC ID N°: 42)
fCmGfCfCdGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG
- 20 ARC439 (SEC ID N°: 43)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCdGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG
- ARC440 (SEC ID N°: 44)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUdAfcCfCfUmGfCmG
- 25 ARC457 (SEC ID N°: 45)
mGfCmGfUfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmAfCmGmC
- ARC458 (SEC ID N°: 46)
mGmGmGfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmCmCmC
- ARC459 (SEC ID N°: 47)
mGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGmC
- 30 ARC473 (SEC ID N°: 48)
mGmGmAfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGfUfCmGfUfCfU-3T
- ARC522 (SEC ID N°: 49)
mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTfUfUAdCdCTmGfCmGmCmC
- 35 ARC523 (SEC ID N°: 50)
mGmGmCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTAdCdCTmGdCmGmCmC
- ARC524 (SEC ID N°: 51)
mGmGmCmGdCdCGdCmGmGTdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTmAdCdCTmGdCmGmCmC
- ARC525 (SEC ID N°: 52)
mGmGmCmGdCdCGdCmGmGTdCmUmCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGmUmCmUmGmAmGTTTmAdCdCTmGdCmGmCmC
- 40

ARC532 (SEC ID N°: 53)

Biotina

A GfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC543 (SEC ID N°: 54)

mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGmCmC

5 ARC544 (SEC ID N°: 55)

mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUmCmUmCmAmGmGmCGfCfUmGmAmGmUmCmUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGmCmC

ARC550 (SEC ID N°: 56)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUmAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC551 (SEC ID N°: 57)

10 fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC552 (SEC ID N°: 58)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGTfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC553 (SEC ID N°: 59)

15 fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUmAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC554 (SEC ID N°: 60)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGTfUfUfUmAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC 657 (SEC ID N°: 61)

PEG 20 kDa-NH-

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC 658 (SEC ID N°: 62)

PEG 30 kDa-NH-

20 fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC 672 (SEC ID N°: 63)

NH2-

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC706 (SEC ID N°: 64)

PEG 10 kDa-NH-

25 fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC1537 (SEC ID N°: 65)

PEG 40 kDa-NH-

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC1730 (SEC ID N°: 66)

PBG20K-NH-

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-NH-PBG20K

ARC1905 (SEC ID N°: 67)

PEG 40 K-NH-

30 fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

En la que el PEG de 40 kDa ramificado es 2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo

ARC243 (SEC ID N°: 68)

35 GGfCGAfUfUAfCfUGGGAfCGGAfCfUfCGfCGAfUGfUGAGfCfCAGAfCGAfCfUfCGfCfC

ARC244 (SEC ID N°: 69)

GGfCfUfUfCfUGAAGAfUfUAfUfUfUfCfGfCGAfUGfUGAAfCfUfCfCAGAfCfCfCfC

En algunas realizaciones los productos terapéuticos de aptámero de la presente invención tienen gran afinidad y especificidad por sus dianas mientras que reducen los efectos secundarios deletéreos de sustituciones de nucleótidos de origen no natural si los productos terapéuticos de aptámero se degradan en el cuerpo de pacientes o sujetos. En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas que contienen los productos terapéuticos de aptámero de la presente invención no tienen o tienen una cantidad reducida de nucleótidos fluorados.

Los aptámeros de la presente invención pueden sintetizarse usando cualquier técnica de síntesis de oligonucleótidos conocida en este campo incluyendo técnicas de síntesis de oligonucleótidos de fase sólida bien conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Froehler *et al.*, Nucl. Acid Res. 14: 5399-5467 (1986) y Froehler *et al.*, Tet. Lett. 27: 5575-5578 (1986)) y métodos de fase de solución tales como métodos de síntesis de triéster (véase, por ejemplo, Sood *et al.*, Nucl. Acid Res. 4: 2557 (1977) y Hirose *et al.*, Tet. Lett., 28: 2449 (1978)).

Composiciones farmacéuticas

La invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen moléculas de aptámeros que se unen con la proteína del complemento C5. En algunas realizaciones, las composiciones son adecuadas para su uso interno e incluyen una cantidad eficaz de un compuesto farmacológicamente activo de la invención, solo o en combinación, con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos son especialmente útiles porque tienen toxicidad muy baja, si la tienen.

Las composiciones de la invención pueden usarse para tratar o prevenir una patología, tal como una enfermedad o trastorno, o aliviar los síntomas de dicha enfermedad o trastorno en un paciente. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir una patología asociada con trastornos cardiacos relacionados con el complemento (por ejemplo, lesión miocárdica; complicaciones del complemento mediadas por C5 relacionadas con cirugía de injerto de derivación de arterias coronarias (CABG) tales como hemorragia postoperatoria, activación de neutrófilos y leucocitos sistémica, aumento del riesgo de infarto de miocardio y aumento de la disfunción cognitiva; reestenosis; y complicaciones mediadas por C5 relacionadas con intervención coronaria percutánea); lesión de reperfusión por isquemia (por ejemplo, infarto de miocardio, ictus, congelación); trastornos inflamatorios relacionados con el complemento (por ejemplo, asma, artritis, septicemia y rechazo después de trasplante de órganos); y trastornos autoinmunitarios relacionados con el complemento (por ejemplo, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (LES o lupus); inflamación pulmonar; activación del complemento extracorpórea; activación del complemento mediada por anticuerpo; e indicaciones oculares tales como retinopatía diabética. Las composiciones de la invención son útiles para administración a un sujeto que padece, o está predispuesto a, una enfermedad o trastorno que está relacionado con o deriva de la proteína del complemento C5 con la que se unen específicamente los aptámeros de la invención.

Las composiciones de la invención pueden usarse en un método para tratar a un paciente o sujeto que tenga una patología. Los métodos de la invención implican administrar al paciente o sujeto un aptámero o una composición que comprende aptámeros que se unen con la proteína del complemento C5, de modo que la unión del aptámero con la proteína del complemento C5 altere su función biológica, tratando de este modo la patología.

El paciente o sujeto que tiene una patología, es decir, el paciente o sujeto tratado por los métodos de la presente invención puede ser un vertebrado, más particularmente un mamífero, o más particularmente, un ser humano.

En la práctica, los aptámeros o sus sales farmacéuticamente aceptables, se administran en cantidades que serán suficientes para ejercer su actividad biológica deseada, por ejemplo, inhibir la unión de la diana del aptámero con su receptor, evitando la escisión de una proteína diana.

Un aspecto de la invención comprende una composición de aptámero de la invención en combinación con otros tratamientos para trastornos del complemento mediados por C5. La composición de aptámero de la invención puede contener, por ejemplo, más de un aptámero. En algunos ejemplos, una composición de aptámero de la invención, que contiene uno o más compuestos de la invención, se administra en combinación con otra composición útil tal como un agente antiinflamatorio, un inmunosupresor, un agente antiviral o similares. Además, los compuestos de la invención pueden administrarse en combinación con un agente citotóxico, citostático o quimioterapéutico tal como un agente alquilante, antimetabolito, inhibidor mitótico o antibiótico citotóxico, como se ha descrito anteriormente. En general, las formas de dosificación disponibles actualmente de los agentes terapéuticos conocidos para su uso en dichas combinaciones serán adecuadas.

La "terapia de combinación" (o "coterapia") incluye la administración de una composición de aptámero de la invención y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico que se pretende que proporcione el efecto beneficioso de la coacción de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero sin limitación, coacción farmacocinética o fármaco dinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación normalmente se lleva a cabo durante un periodo de tiempo definido (habitualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada).

Puede pretenderse, pero en general no se pretende, que la "terapia de combinación" abarque la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia separados que de forma casual y arbitraria den como resultado las combinaciones de la presente invención. Se pretende que la "terapia de combinación" abarque la administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, es decir, en la que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea. Puede conseguirse administración sustancialmente simultánea, por ejemplo, administrando al sujeto una única cápsula que tenga una relación fija de cada agente terapéutico o en múltiples cápsulas individuales para cada uno de los agentes terapéuticos.

Puede efectuarse administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico por cualquier vía apropiada incluyendo, pero sin limitación, vías tópicas, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de la membrana mucosa. Los agentes terapéuticos pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada puede administrarse por inyección mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación pueden administrarse por vía tópica.

Como alternativa, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía tópica o todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por inyección. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos no es estrechamente crítica a no ser que se indique de otro modo. La "terapia de combinación" también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos como se ha descrito anteriormente en combinación adicional con otros principios biológicamente activos. Cuando la terapia de combinación comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se consiga un efecto beneficioso de la coacción de la combinación de los agentes terapéuticos y tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso aún se consigue cuando el tratamiento no farmacológico se retira temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás en días o incluso semanas.

Las composiciones terapéuticas o farmacológicas de la presente invención generalmente comprenderán una cantidad eficaz del componente o los componentes activos de la terapia, disueltos o dispersados en un medio farmacéuticamente aceptable. Los medios o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones terapéuticas de la presente invención.

La preparación de composiciones farmacéuticas o farmacológicas se conocerá por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Normalmente, dichas composiciones pueden prepararse como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección; como comprimidos u otros sólidos para administración oral; como cápsulas de liberación temporalizada; o en cualquier otra forma usada habitualmente, incluyendo colirio, cremas, lociones, pomadas, inhalantes y similares. El uso de formulaciones estériles, tales como lavados basados en solución salina, por los cirujanos, médicos o trabajadores de cuidados sanitarios para tratar un área particular en el campo operatorio también puede ser particularmente útil. Las composiciones también pueden suministrarse mediante microdispositivo, micropartícula o esponja.

Tras su formulación, los productos terapéuticos se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y con una cantidad que sea farmacológicamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación farmacológica y similares.

En este contexto, la cantidad de principio activo y volumen de composición para administrar dependen del animal hospedador para tratar. Las cantidades precisas de compuesto activo requerido para administración dependen del criterio del facultativo y son peculiares para cada individuo.

Se utiliza normalmente un volumen mínimo de una composición requerida para dispersar los compuestos activos. También son variables los regímenes adecuados para administración, pero se tipificarían administrando inicialmente el compuesto y controlando los resultados y proporcionando después dosis controladas adicionalmente a intervalos adicionales.

Por ejemplo, para administración oral en forma de un comprimido o cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), el componente farmacológico activo puede combinarse con un vehículo oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable inerte tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse aglutinantes adecuados, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes en la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de aluminio magnésico, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa,

5 edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábica, tragacanto o alginato sódico, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato sódico, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, almidones de goma de xantano, agar, ácido algínico o su sal sódica, o mezclas efervescentes, y similares. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

10 Las composiciones inyectables son preferentemente soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y se preparan provechosamente supositorios a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes tales como agentes conservantes, estabilizadores, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, pueden contener también otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan de acuerdo con métodos de mezcla, granulación o recubrimiento convencionales, respectivamente, y normalmente contienen de aproximadamente 0,1 a 75 %, preferentemente de aproximadamente 1 a 50 %, del principio activo.

15 Los compuestos de la invención también pueden administrarse en formas de dosificación oral tales como comprimidos o cápsulas de liberación temporalizada y de liberación prolongada, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones.

20 Pueden prepararse composiciones líquidas, particularmente inyectables, por ejemplo, por disolución, dispersión, etc. El compuesto activo se disuelve en o se mezcla con un disolvente farmacéuticamente puro tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar de este modo la solución o suspensión inyectable. Adicionalmente, pueden formularse formas sólidas adecuadas para disolver en líquido antes de la inyección.

25 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en forma intravenosa (tanto en embolada como en infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, todas usando formas bien conocidas para los expertos habituales en la técnica farmacéutica. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, bien como soluciones o bien como suspensiones líquidas.

30 Generalmente se usa administración inyectable parenteral para inyecciones e infusiones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Adicionalmente, un enfoque para la administración parenteral emplea la implantación de un sistema de liberación lenta o liberación prolongada, que asegura que se mantenga un nivel constante de dosificación, de acuerdo con la Patente de Estados Unidos N° 3.710.795.

35 Además, pueden administrarse compuestos preferidos para la presente invención en forma intranasal mediante el uso tópico de vehículos intranasales adecuados, inhalantes o mediante vías transdérmicas, usando las formas de parches cutáneos transdérmicos bien conocidas por los expertos en la materia. Para administrar en forma de un sistema de suministro transdérmico, la administración de dosificación será, por supuesto, continua en lugar de intermitente durante todo el régimen de dosificación. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, pomadas, lociones, pulverizaciones de aerosol y geles, en las que la concentración de principio activo variaría normalmente de 0,01 % a 15 %, p/p o p/v.

40 Para composiciones sólidas, pueden usarse excipientes que incluyen usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. El compuesto activo definido anteriormente, también puede formularse como supositorios usando por ejemplo, polialquilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol, como el vehículo. En algunas realizaciones, se preparan provechosamente supositorios a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

45 Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de suministro de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Pueden formarse liposomas a partir de diversos fosfolípidos, que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, se hidrata una película de componentes lipídicos con una solución acuosa de fármaco para formar una capa lipídica que encapsula el fármaco, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.262.564. Por ejemplo, las moléculas de aptámero descritas en el presente documento pueden proporcionarse como un complejo con un compuesto lipófilo o compuesto de alto peso molecular, no inmunogénico, construido usando métodos conocidos en la técnica. Se proporciona un ejemplo de complejos asociados a ácidos nucleicos en la Patente de Estados Unidos N° 6.011.020.

50 Los compuestos de la presente invención también pueden acoplarse con polímeros solubles como vehículos farmacológicos dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilspanamidafenol o polietilenoóxido-polilisina sustituida con restos de palmitoilo. Además, los compuestos de la presente invención pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, caprolactona poliépsilon, ácido polihidroxi butírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de hidrogeles en

bloque anfipáticos o reticulados.

Si se desea, la composición farmacéutica para administrar puede contener también cantidades menores de sustancias adyuvantes no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH y otras sustancias tales como por ejemplo, acetato sódico y oleato de trietanolamina.

El régimen de dosificación que utiliza los aptámeros se selecciona de acuerdo con diversos factores incluyendo el tipo, especie, edad, peso, sexo y condición médica del paciente; la gravedad de la afección para tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el aptámero particular o sal del mismo empleado. Un médico o veterinario experto habitual en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz del fármaco requerido para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

Las dosificaciones orales de la presente invención, cuando se usen para los efectos indicados, variarán entre aproximadamente 0,05 y 7500 mg/día por vía oral. Las composiciones se proporcionan preferentemente en forma de comprimidos ranurados que contienen 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100,0, 250,0, 500,0 y 1000,0 mg de principio activo. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en una única dosis diaria, o la dosificación diaria total puede administrarse en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día.

Las dosificaciones infundidas, dosificaciones intranasales y dosificaciones transdérmicas variarán entre 0,05 y 7500 mg/día. Las dosificaciones subcutáneas, intravenosas e intraperitoneales variarán entre 0,05 y 3800 mg/día.

Los niveles de plasma eficaces de los compuestos de la presente invención varían de 0,002 mg/ml a 50 mg/ml.

Modulación de la farmacocinética y biodistribución de los productos terapéuticos de aptámero

Es importante que las propiedades farmacocinéticas de todos los productos terapéuticos basados en oligonucleótidos, incluyendo aptámeros, se adapten para ajustarse a la aplicación farmacéutica deseada. Aunque los aptámeros dirigidos contra dianas extracelulares no padecen dificultades asociadas con el suministro intracelular (como sucede con productos terapéuticos antisentido y basados en ARNi), dichos aptámeros aún deben ser capaces de distribuirse a órganos y tejidos diana, y permanecer en el cuerpo (no modificados) durante un periodo de tiempo coherente con el régimen de dosificación deseado.

Por lo tanto, la presente invención proporciona materiales y métodos para afectar a la farmacocinética de composiciones de aptámero y, en particular, la capacidad para ajustar la farmacocinética del aptámero. La adaptabilidad (es decir, la capacidad para modular) la farmacocinética de aptámero se consigue mediante conjugación de restos modificadores (por ejemplo, polímeros de PEG) con el aptámero y/o la incorporación de nucleótidos modificados (por ejemplo, 2'-fluoro o 2'-OMe) para alterar la composición química del ácido nucleico. La capacidad para ajustar la farmacocinética de aptámero se usa en la mejora de aplicaciones terapéuticas existentes, o como alternativa, en el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en situaciones antineoplásicas o de cuidados agudos en las que puede desearse eliminación o inactivación de fármacos rápida, es deseable reducir los tiempos de residencia de aptámeros en circulación. Como alternativa, en otras aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, terapias de mantenimiento cuando se desee circulación sistémica de un producto terapéutico, puede ser deseable aumentar los tiempos de residencia de aptámeros en circulación.

Además, la adaptabilidad de farmacocinética de aptámero se usa para modificar la biodistribución de un producto terapéutico de aptámero en un sujeto. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable alterar la biodistribución de un producto terapéutico de aptámero en un intento de dirigir a un tipo particular de tejido o un órgano específico (o conjunto de órganos). En estas aplicaciones, el producto terapéutico de aptámero preferentemente se acumula en un tejido u órgano u órganos específicos. En otras aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable dirigir a tejidos que presentan un marcador celular o un síntoma asociado con una enfermedad dada, lesión celular u otra patología anómala, de modo que el producto terapéutico de aptámero preferentemente se acumule en el tejido afectado. Por ejemplo, como se describe en el documento US 2006/0030535 A1 titulado "Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics", se usa la PEGilación de un producto terapéutico de aptámero (por ejemplo, PEGilación con un polímero de PEG de 20 kDa) para dirigirse a tejidos inflamados, de modo que el producto terapéutico de aptámero PEGilado preferentemente se acumule en tejido inflamado.

Para determinar los perfiles farmacocinéticos y de biodistribución de productos terapéuticos de aptámero (por ejemplo, conjugados de aptámero o aptámeros que tienen química alterada, tales como nucleótidos modificados), se controlan diversos parámetros. Dichos parámetros incluyen, por ejemplo, la semivida ($t_{1/2}$), la eliminación de plasma (Cl), el volumen de distribución (V_{ss}), el área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC), la concentración en suero o plasma observada máxima ($C_{máx}$), y el tiempo de residencia medio (MRT) de una composición de aptámero. Como se usa en el presente documento, el término "AUC" se refiere al área bajo la representación de la concentración de plasma de un producto terapéutico de aptámero frente al tiempo después de administración de aptámero. El valor de AUC se usa para estimar la biodisponibilidad (es decir, el porcentaje de producto terapéutico

de aptámero administrado en la circulación después de la administración de aptámero) y/o la eliminación total (C1) (es decir, la velocidad a la que el producto terapéutico de aptámero se retira de la circulación) de un producto terapéutico de aptámero dado. El volumen de distribución relaciona la concentración en plasma de un producto terapéutico de aptámero con la cantidad de aptámero presente en el cuerpo. Cuanto mayor sea el Vss, más aptámero se encuentra fuera del plasma (es decir, más extravasación).

La presente invención proporciona materiales y métodos para modular, de una manera controlada, la farmacocinética y biodistribución de composiciones de aptámero estabilizadas *in vivo* conjugando un aptámero con un resto modulador tal como molécula pequeña, péptido o grupo terminal polimérico o incorporando nucleótidos modificados en un aptámero. Como se describe en el presente documento, la conjugación de un resto modificador y/o composición química de nucleótido o nucleótidos de alteración altera aspectos fundamentales del tiempo de residencia del aptámero en circulación y distribución a tejidos.

Además de la eliminación por nucleasas, los productos terapéuticos oligonucleotídicos se someten a eliminación mediante filtración renal. Como tal, un oligonucleótido resistente a nucleasa administrado por vía intravenosa normalmente muestra una semivida *in vivo* de <10 minutos, a no ser que pueda bloquearse la filtración. Esto puede conseguirse facilitando la distribución rápida fuera del torrente sanguíneo a tejidos o aumentando el peso molecular aparente del oligonucleótido por encima del punto de corte de tamaño eficaz para el glomérulo. La conjugación de productos terapéuticos pequeños con un polímero de PEG (PEGilación), descrita posteriormente, puede alargar drásticamente los tiempos de residencia de aptámeros en circulación, reduciendo de este modo la frecuencia de dosificación y potenciando su eficacia contra dianas vasculares.

Pueden conjugarse aptámeros con diversos restos modificadores, tales como polímeros de alto peso molecular, por ejemplo, PEG; péptidos, por ejemplo, Tat (un fragmento de 13-aminoácidos de la proteína Tat de VIH (Vives, *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.* 272(25): 16010-7)), Ant (una secuencia de 16 aminoácidos derivada de la tercera hélice de la proteína homeótica antennapedia de *Drosophila* (Pietersz, *et al.* (2001), *Vaccine* 19(11-12): 1397-405)) y Arg₇ (un péptido corto, cargado positivamente que permea células compuesto de poliarginina (Arg₇) (Rothbard, *et al.* (2000), *Nat. Med.* 6(11): 1253-7; Rothbard, *J et al.* (2002), *J. Med. Chem.* 45(17): 3612-8)); y moléculas pequeñas, por ejemplo, compuestos lipófilos tales como colesterol. Entre los diversos conjugados descritos en el presente documento, las propiedades *in vivo* de los aptámeros se alteran más profundamente por la formación de complejos con grupos PEG. Por ejemplo, la formación de complejo de un producto terapéutico de aptámero modificado mixto 2'-F y 2'-OMe con un polímero de PEG de 20 kDa obstaculiza la filtración renal y promueve la distribución de aptámeros a tejidos tanto sanos como inflamados. Además, el conjugado de aptámero-polímero de PEG de 20 kDa demuestra ser casi tan eficaz como un polímero de PEG de 40 kDa en la prevención de la filtración renal de aptámeros. Aunque un efecto de la PEGilación es la eliminación de aptámeros, la exposición sistémica prolongada proporcionada por la presencia del resto de 20 kDa también facilita la distribución del aptámero a tejidos, particularmente los de órganos altamente perfundidos y los del sitio de inflamación. El conjugado de polímero de PEG de 20 kDa-aptámero dirige la distribución de aptámero al sitio de inflamación, de modo que el aptámero PEGilado preferentemente se acumula en el tejido inflamado. En algunos casos, el conjugado de aptámero PEGilado de 20 kDa puede acceder al interior de las células, tales como, por ejemplo, células renales.

En general, los efectos sobre la farmacocinética y distribución tisular del aptámero producidos por restos modificadores de bajo peso molecular, incluyendo colesterol y péptidos que permean en células son menos pronunciados que los producidos como resultado de PEGilación o modificación de nucleótidos (por ejemplo, una composición química alterada). Aunque sin pretender quedar ligado a la teoría, se sugiere que las asociaciones mediadas por colesterol con lipoproteínas del plasma, que se postula que se producen en el caso del conjugado antisentido, se excluyen en el contexto particular de la estructura plegada de conjugado de aptámero-colesterol y/o se relaciona con un aspecto de la naturaleza lipófila del grupo de colesterol. Como el colesterol, la presencia de un marcador peptídico de Tat promueve la eliminación del aptámero del torrente sanguíneo, apareciendo niveles de conjugado comparativamente altos en los riñones a las 48 horas. No parece que otros péptidos (por ejemplo, Ant, Arg₇) que se ha indicado en la técnica que median en el paso de macromoléculas a través de membranas celulares *in vitro* promuevan la eliminación de aptámeros de la circulación. Sin embargo, como Tat, el conjugado de Ant se acumula significativamente en los riñones en relación con otros aptámeros. Aunque sin pretender quedar ligado a la teoría, es posible que la presentación desfavorable de los restos modificadores de péptidos Ant y Arg₇ en el contexto de aptámeros plegados de forma tridimensional *in vivo* altere la capacidad de estos péptidos para influir en las propiedades de transporte de aptámeros.

También pueden usarse nucleótidos modificados para modular la eliminación de aptámeros en plasma. Por ejemplo, un aptámero conjugado que incorpora química estabilizadora tanto de 2'-F como de 2'-OMe, que es típica de los aptámeros de la generación actual ya que muestra un alto grado de estabilidad de nucleasa *in vitro* e *in vivo*, presenta rápida pérdida del plasma (es decir, rápida eliminación de plasma) y una rápida distribución a tejidos, principalmente al riñón, en comparación con un aptámero no modificado.

Ácidos nucleicos derivatizados con PEG

Como se ha descrito anteriormente, la derivatización de ácidos nucleicos con polímeros no inmunogénicos de alto peso molecular tiene el potencial de alterar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de ácidos nucleicos haciéndolos agentes terapéuticos más eficaces. Los cambios favorables en la actividad pueden incluir resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, filtración reducida a través de los riñones, exposición reducida al sistema inmunitario y distribución alterada del producto terapéutico a través del cuerpo.

Las composiciones de aptámeros de la invención pueden derivatizarse con restos de polialquilenglicol ("PAG"). Se encuentran ejemplos de ácidos nucleicos derivatizados con PAG en el documento US 2004/0180360 A1. Los polímeros típicos usados en la invención incluyen poli(etilenglicol) ("PEG"), también conocido como poli(etilen óxido) ("PEO") y polipropilenglicol (incluyendo poli isopropilenglicol). Adicionalmente, pueden usarse copolímeros aleatorios o en bloque de diferentes óxidos de alquileo (por ejemplo, óxido de etileno y óxido de propileno) en muchas aplicaciones. En su forma más común, un polialquilenglicol, tal como PEG, es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos hidroxilo: HO-CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-OH. Este polímero, alfa, omega-dihidroxipoli(etilenglicol), también puede representarse como HO-PEG-OH, donde se entiende que el símbolo -PEG- representa la siguiente unidad estructural: -CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂- donde n normalmente varía de aproximadamente 4 a aproximadamente 10.000.

Como se muestra, la molécula de PEG es difuncional y en ocasiones se denomina "PEG diol". Las partes terminales de la molécula de PEG son restos hidroxilo relativamente no reactivos, los grupos -OH, que pueden activarse, o convertirse en restos funcionales, para la unión del PEG con otros compuestos en sitios reactivos del compuesto. Dichos PEG dioles activados se denominan en el presente documento PEG biactivados. Por ejemplo, los restos terminales de PEG diol se han funcionalizado como éster de carbonato activo para reacción selectiva con restos amino por sustitución de los restos hidroxilo relativamente no reactivos -OH, con restos de éster activo de succinimidil de N-hidroxi succinimida.

En muchas aplicaciones, es deseable recubrir la molécula de PEG en un extremo con un resto esencialmente no reactivo de modo que la molécula de PEG sea monofuncional (o monoactivada). En el caso de productos terapéuticos proteicos que generalmente presentan múltiples sitios de reacción para PEG activados, los PEG activados bifuncionales conducen a reticulación extensiva, produciendo agregados escasamente funcionales. Para generar PEG monoactivados, un resto de hidroxilo en el extremo de la molécula de PEG diol normalmente se sustituye con un resto de extremo metoxi no reactivo, -OCH₃. El otro extremo, no protegido, de la molécula de PEG normalmente se convierte en un resto final reactivo que puede activarse con respecto a unión en un sitio reactivo en una superficie o una molécula tal como una proteína.

Los PAG son polímeros que normalmente tienen las propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos, carecen de toxicidad y carecen de inmunogenicidad. Un uso de PAG es unir covalentemente el polímero con moléculas insolubles para hacer el "conjugado" de molécula-PAG resultante soluble. Por ejemplo, se ha mostrado que el fármaco insoluble en agua paclitaxel, cuando se acopla a PEG, se hace soluble en agua. Greenwald, *et al.*, J. Org. Chem., 60: 331-336 (1995). Los conjugados de PAG se usan con frecuencia no solamente para potenciar la solubilidad y estabilidad sino también para prolongar la semivida en circulación en sangre de las moléculas.

Los compuestos polialquilados de la invención son normalmente de entre 5 y 80 kD de tamaño, sin embargo puede usarse cualquier tamaño, dependiendo la elección del aptámero y la aplicación. Otros compuestos de PAG de la invención son de entre 10 y 80 kD de tamaño. Otros compuestos de PAG más de la invención son de entre 10 y 60 kD de tamaño. Por ejemplo, un polímero de PAG puede ser de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 u 80 kD de tamaño. Dichos polímeros pueden ser lineales o ramificados.

A diferencia de los productos terapéuticos proteicos expresados biológicamente, los productos terapéuticos de ácido nucleico se sintetizan normalmente de forma química a partir de nucleótidos monoméricos activados. Pueden prepararse conjugados de ácido nucleico-PEG incorporando el PEG usando la misma síntesis monomérica por iteraciones. Por ejemplo, los PEG activados por conversión a una forma de fosforamidita pueden incorporarse en síntesis de oligonucleótidos de fase sólida. Como alternativa, la síntesis de oligonucleótidos puede completarse con incorporación específica de sitio de un sitio de unión a PEG reactivo. Más habitualmente esto se ha conseguido mediante la adición de una amina primaria libre en el extremo 5' terminal (incorporada usando una fosforamidita modificada en la última etapa de acoplamiento de síntesis de fase sólida). Usando este enfoque, se combina un PEG reactivo (por ejemplo, uno que está activado de modo que reaccione y forme un enlace con una amina) con el oligonucleótido purificado y la reacción de acoplamiento se lleva a cabo en solución. En algunas realizaciones los polímeros son moléculas de PEG ramificadas. En otras realizaciones más los polímeros son PEG ramificados de 40 kDa, véase, por ejemplo (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida)) representado en la Figura 4. En algunas realizaciones el PEG ramificado de 40 kDa (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida)) se une con el extremo 5' del aptámero como se representa en la Figura 5.

- La capacidad de la conjugación de PEG para alterar la biodistribución de un producto terapéutico se relaciona con varios factores incluyendo el tamaño aparente (por ejemplo, como se mide con respecto a radio hidrodinámico) del conjugado. Se sabe que los conjugados mayores (>10 kDa) bloquean más eficazmente la filtración mediante el riñón y que aumentan en consecuencia la semivida en suero de macromoléculas pequeñas (por ejemplo, péptidos, oligonucleótidos antisentido). Se ha mostrado que la capacidad de los conjugados de PEG para bloquear la filtración aumenta con el tamaño de PEG hasta aproximadamente 50 kDa (aumentos adicionales tienen un efecto beneficioso mínimo ya que la semivida se define por el metabolismo mediado por macrófagos en lugar de la eliminación a través de los riñones).
- La producción de PEG de alto peso molecular (>10 kDa) puede ser difícil, ineficaz y cara. Como una vía para la síntesis de conjugados de ácido nucleico-PEG de alto peso molecular, los trabajos anteriores se han centrado en la generación de PEG activados de mayor peso molecular. Un método para generar dichas moléculas implica la formación de un PEG activado ramificado en el que dos o más PEG están unidos a un núcleo central que porta el grupo activado. Las partes terminales de estas moléculas de PEG de mayor peso molecular, es decir, los restos de hidroxilo (-OH) relativamente no reactivos, pueden activarse, o convertirse en restos funcionales, para la unión de uno o más de los PEG con otros compuestos en sitios reactivos del compuesto. Los PEG activados ramificados tendrán más de dos extremos, y en casos en los que se hayan activado dos o más extremos, dichas moléculas de PEG de mayor peso molecular activadas se denominan en el presente documento, PEG multiactivados. En algunos casos, no todos los extremos en una molécula de PEG ramificada se activan. En casos en los que dos extremos cualesquiera de una molécula de PEG ramificada estén activados, dichas moléculas de PEG se denominan PEG biactivados. En algunos casos en los que solamente se activa un extremo en una molécula de PEG ramificada, dichas moléculas de PEG se denominan monoactivadas. Como un ejemplo de este enfoque, se ha descrito PEG activado preparado por la unión de dos monometoxi PEG con un núcleo de lisina que se activa posteriormente para reacción (Harris *et al.*, Nature, vol. 2: 214-221, 2003).
- La presente invención proporciona otra vía rentable para la síntesis de conjugados de PEG de alto peso molecular-ácido nucleico (preferentemente, aptámero) incluyendo ácidos nucleicos PEGilados de forma múltiple. La presente invención también abarca oligonucleótidos multiméricos ligados a PEG, por ejemplo, aptámeros dimerizados. La presente invención también se refiere a composiciones de alto peso molecular en las que un resto estabilizador de PEG es un adaptador que separa diferentes partes de un aptámero, por ejemplo, el PEG está conjugado dentro de una única secuencia de aptámero, de modo que la distribución lineal de la composición de aptámero de alto peso molecular es, por ejemplo, ácido nucleico-PEG-ácido nucleico (-PEG-ácido nucleico)_n en la que n es mayor de o igual a 1.
- Las composiciones de alto peso molecular de la invención incluyen las que tienen un peso molecular de al menos 10 kD. Las composiciones normalmente tienen un peso molecular entre 10 y 80 kD de tamaño. Las composiciones de alto peso molecular de la invención son de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 u 80 kD de tamaño.
- Una molécula estabilizadora es una molécula, o parte de una molécula, que mejora las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de las composiciones de aptámero de alto peso molecular de la invención. En algunos casos, un resto estabilizador es una molécula o parte de una molécula que pone dos o más aptámeros, o dominios de aptámero, en proximidad, o proporciona libertad rotacional global reducida de las composiciones de aptámero de alto peso molecular de la invención. Un resto estabilizador puede ser un polialquilenglicol, tal como polietilenglicol, que puede ser lineal o ramificado, un homopolímero o un heteropolímero. Otros restos estabilizadores incluyen polímeros tales como ácidos péptido nucleicos (PNA). Los oligonucleótidos también pueden ser restos estabilizadores; dichos oligonucleótidos pueden incluir nucleótidos modificados, y/o enlaces modificados, tales como fosforotioatos. Un resto estabilizador puede ser una parte integral de una composición de aptámero, es decir, está unida covalentemente con el aptámero.
- Las composiciones de la invención incluyen composiciones de aptámero de alto peso molecular en las que dos o más restos de ácido nucleico están conjugados covalentemente con al menos un resto de polialquilenglicol. Los restos de polialquilenglicol actúan como restos estabilizadores. En composiciones en las que un resto de polialquilenglicol está unido covalentemente en uno de los extremos de un aptámero, de modo que el polialquilenglicol se une con los restos de ácido nucleico juntos en una molécula, se dice que el polialquilenglicol es un resto adaptador. En dichas composiciones, la estructura primaria de la molécula covalente incluye el ordenamiento lineal de ácido nucleico-PAG-ácido nucleico. Un ejemplo es una composición que tiene la estructura primaria ácido nucleico-PEG-ácido nucleico. Otro ejemplo es una ordenación lineal de: ácido nucleico-PEG-ácido nucleico-PEG-ácido nucleico.
- Para producir el conjugado de ácido nucleico-PEG-ácido nucleico, el ácido nucleico se sintetiza originalmente de modo que porte un único sitio reactivo (por ejemplo, está monoactivado). En una realización preferida, el sitio reactivo es un grupo amino introducido en el extremo 5' terminal por adición de una fosforamidita modificada como la última etapa en síntesis de fase sólida del oligonucleótido. Después de la desprotección y purificación del oligonucleótido modificado, se reconstituye a alta concentración en una solución que minimiza la hidrólisis espontánea del PEG activado. En una realización preferida, la concentración de oligonucleótidos es 1 mM y la solución reconstituida contiene tampón de NaHCO₃ 200 mM, pH 8,3. La síntesis del conjugado se inicia por adición

por etapas, lenta, de PEG bifuncional altamente purificado. En una realización preferida, el PEG diol está activado en ambos extremos (biactivado) por derivatización con succinimidil propionato. Después de la reacción, el conjugado de ácido nucleico-PEG se purifica por electroforesis en gel o cromatografía líquida para separar especies completamente, parcialmente y no conjugadas. Múltiples moléculas de PAG concatenadas (por ejemplo, como copolímeros aleatorios o en bloque) o cadenas de PAG más pequeñas pueden unirse para conseguir diversas longitudes (o pesos moleculares). Pueden usarse adaptadores no PAG entre cadenas de PAG de diversas longitudes.

El 2'-OMe, 2'-fluoro y otras modificaciones de nucleótidos modificados estabilizan el aptámero contra nucleasas y aumentan su semivida *in vivo*. El recubrimiento 3'-3'-dT también aumenta la resistencia a exonucleasa. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos 5.674.685; 5.668.264; 6.207.816; y 6.229.002.

Derivatización con PAG de un ácido nucleico reactivo

Pueden prepararse conjugados de PAG-ácido nucleico-PAG de alto peso molecular por reacción de un PEG activado monofuncional con un ácido nucleico que contiene más de un sitio reactivo. En una realización, el ácido nucleico es birreactivo, o está biactivado, y contiene dos sitios reactivos: un grupo amino 5' y un grupo amino 3' introducidos en el oligonucleótido mediante síntesis de fosforamidita convencional, por ejemplo: 3'-5'-di-PEGilación como se ilustra en la Figura 6. En realizaciones alternativas, pueden introducirse sitios reactivos en posiciones internas, usando por ejemplo, la posición 5 de pirimidinas, la posición 8 de purinas, o la posición 2' de ribosa como sitios para unión de aminas primarias. En dichas realizaciones, el ácido nucleico puede tener varios sitios activados o reactivos y se dice que está activado de forma múltiple. Después de síntesis y purificación, el oligonucleótido modificado se combina con el PEG monoactivado en condiciones que promueven la reacción selectiva con los sitios reactivos de oligonucleótidos minimizando la hidrólisis espontánea. En la realización preferida, el monometoxi-PEG se activa con succinimidil propionato y la reacción acoplada se lleva a cabo a pH 8,3. Para conducir la síntesis del PEG bisustituido, se proporciona PEG en exceso estequiométrico en relación con el oligonucleótido. Después de la reacción, el conjugado de PEG-ácido nucleico se purifica por electroforesis en gel o cromatografía líquida para separar especies completa, parcialmente y no conjugadas.

Los dominios de unión también pueden tener uno o más restos de polialquilenglicol unidos a los mismos. Dichos PAG pueden ser de diversas longitudes y pueden usarse en combinaciones apropiadas para conseguir el peso molecular deseado de la composición.

El efecto de un adaptador particular puede verse influido tanto por su composición química como por su longitud. Un adaptador que es demasiado largo, demasiado corto o forma interacciones estéricas y/o iónicas desfavorables con la diana impedirá la formación de complejo entre el aptámero y la diana. Un adaptador, que es más largo de lo necesario para abarcar la distancia entre los ácidos nucleicos, puede reducir la estabilidad de unión disminuyendo la concentración eficaz del ligando. Por lo tanto, es con frecuencia necesario optimizar las composiciones del adaptador y sus longitudes para maximizar la afinidad de un aptámero con una diana.

No se pretende que la enumeración de publicaciones y documentos de patente sea una admisión de que ninguno sea técnica anterior pertinente, ni constituye ninguna admisión con respecto a los contenidos o fecha de los mismos. Habiéndose descrito ahora la invención mediante descripción escrita, los expertos en la materia reconocerán que la invención puede practicarse en diversas realizaciones y que la descripción anterior y los ejemplos posteriores son para fines de ilustración y no limitación de las reivindicaciones a continuación.

EJEMPLO 1

Actividad de aptámero anti-C5 en las rutas del complemento clásica y alternativa

Ejemplo 1A: ensayo de hemolisis.

El ensayo de CH50 mide la capacidad del sistema del complemento en una muestra de ensayo de suero para lisis el 50 % de las células en una suspensión normalizada de eritrocitos de oveja recubiertos con anticuerpos. Se mezcló una solución de suero humano al 0,2 % con eritrocitos de oveja recubiertos con anticuerpos (Kit de CH50 del Complemento Diamedix EZ, Diamedix Corp., Miami, FL) en presencia o ausencia de diversos aptámeros anti C5. El ensayo se procesó de acuerdo con el protocolo del kit en solución salina tamponada con veronal que contenía calcio, magnesio y gelatina 1 % (tampón de complemento GVB⁺⁺) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron para sedimentar eritrocitos intactos. Se leyó la densidad óptica a 412 nm (DO₄₁₂) del sobrenadante para cuantificar la liberación de hemoglobina soluble, que es proporcional al grado de hemolisis (Green *et al.*, (1995) Chem. Biol. 2: 683-95). Para verificar que los aptámeros bloqueaban la activación de C5, se analizaron algunos sobrenadantes de hemolisis con respecto a la presencia de C5a y C5b-9 por ELISA (kit de ELISA de C5b-9, Quidel, San Diego, CA; kit de ELISA de C5a, BD Biosciences, San Diego, CA) siguiendo los protocolos del kit de ELISA.

La adición de un aptámero anti C5 no PEGilado (ARC186) (SEC ID N°: 4) a la mezcla de reacción inhibió la hemólisis de una manera dependiente de dosis, como se muestra en la gráfica de la Figura 7A, con una CI_{50} de $0,5 \pm 0,1$ nM, (véase Figura 7B), un valor que es coherente con la K_D determinada por filtración con nitrocelulosa. A concentraciones de aptámero muy altas (>10 nM), el alcance de la hemólisis fue esencialmente indistinguible del fondo (no se añadió suero), lo que indica que ARC 186 (SEC ID N°: 4) era capaz de bloquear completamente la actividad del complemento. La conjugación del aptámero ARC186 (SEC ID N°: 4) con grupos de PEG de 20 kDa (ARC657; SEC ID N°: 61), 30 kDa (ARC658; SEC ID N°: 62), 40 kDa ramificado (1,3-bis (mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida)) (ARC187; SEC ID N°: 5), 40 kDa ramificado (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo) (ARC1905; SEC ID N°: 67), 40 kDa lineal (ARC1537; SEC ID N°: 65) y 2 x 20 kDa lineal (ARC1730; SEC ID N°: 66) tuvo poco efecto en la actividad inhibidora del aptámero en el ensayo de hemólisis CH50 (Figura 7A-Figura 7D).

En un estudio adicional, la actividad inhibidora del aptámero anti C5 PEGilado ARC1905 ((2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo) de 40 kDa ramificado; SEC ID N°: 67) se comparó con su precursor no PEGilado, ARC672 (SEC ID N° 63) que contiene una amina 5' terminal, en el ensayo de hemólisis CH50 descrito anteriormente. Se mezcló una solución de suero humano (Innovative Research, Southfield, MI) con eritrocitos de oveja recubiertos con anticuerpos (Kit de CH50 del Complemento Diamedix EZ, Diamedix Corp., Miami, FL) en presencia o ausencia de diversas concentraciones de ARC1905 y ARC627 respectivamente de modo que la concentración final del suero en cada ensayo fue de 0,1 %, y el ensayo se procesó de acuerdo con el protocolo recomendado del fabricante. Las reacciones de hemólisis se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación para asegurar que las células permanecían en suspensión. Al final de la incubación, las células intactas se sedimentaron por centrifugación (2000 rpm, 2 minutos, temperatura ambiente), se transfirieron 200 μ l de sobrenadante a una placa de poliestireno de fondo plano (VWR, cat N° 62409-003). Se leyó la densidad óptica a 415 nm (DO_{415}) del sobrenadante para cuantificar la liberación de hemoglobina soluble. Se calculó el % de inhibición a cada concentración de aptámero medida usando la ecuación $\%inh = 100 - 100 \times (A_{muestra} - A_{sin\ suero}) / (A_{sin\ aptámero} - A_{sin\ suero})$, en la que $A_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra a diversas concentraciones de aptámero, $A_{sin\ suero}$ es la absorbancia debida a la hemólisis de fondo en ausencia de suero (100 % del control de inhibición) y $A_{sin\ aptámero}$ es la absorbancia debida a la actividad del complemento basal en ausencia del aptámero (0 % del control de inhibición). Se determinaron los valores de CI_{50} a partir de una representación del % de inhibición frente a [inhibidor] usando la ecuación $\%inh = (\%inh)_{máximo} \times [inhibidor]^n / (CI_{50} + [inhibidor]^n) + \text{fondo}$. Se calcularon los valores de CI_{90} y CI_{99} a partir de los valores de CI_{50} usando las ecuaciones $CI_{90} = CI_{50} \times [90/(100-90)]^{1/n}$ y $CI_{99} = CI_{50} \times [99/(100-99)]^{1/n}$. Los valores de CI_{50} para ARC1905 y ARC627 en este estudio en paralelo fueron de 0,648 \pm 0,0521 y 0,913 \pm 0,0679 respectivamente (véase también Figura 58) confirmando adicionalmente que la PEGilación tenía poco, o ningún, efecto en la función del aptámero.

El análisis de ELISA de los sobrenadantes de hemólisis indicó que esta inhibición funcional se correlacionaba con el bloqueo de la liberación de C5a. Por lo tanto, los datos de hemólisis muestran que ARC 186 (SEC ID N°: 4), y sus conjugados PEGilados, son inhibidores del complemento altamente potentes que actúan bloqueando la activación catalizada por convertasa de C5.

Los ensayos de hemólisis con material no PEGilado indicaron que el aptámero anti C5 no reacciona de forma cruzada con C5 de varias especies no de primates, incluyendo rata, cobaya, perro y cerdo. Sin embargo, se observó actividad inhibidora significativa en exploraciones de suero de primates, incluyendo suero de macaco cynomolgus, macaco rhesus y chimpancé. La eficacia *in vitro* del aptámero anti C5 se investigó adicionalmente en suero de cynomolgus usando ARC658 (SEC ID N°: 62), el análogo de PEG de 30 kDa de ARC186 (SEC ID N°: 4). En una comparación paralela (n = 3), ARC658 inhibió la actividad del complemento humano con una CI_{50} de $0,21 \pm 0,0$ nM y actividad del complemento de cynomolgus con una CI_{50} de $1,7 \pm 0,4$ nM (Figura 8). Por lo tanto ARC658 (SEC ID N°: 62) es 8 \pm 3 veces menos potente en suero de cynomolgus en comparación con el humano por esta medida.

En un estudio relacionado, los efectos del aptámero anti C5 PEGilado con 40 kDa ramificado (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo), ARC1905 (SEC ID N°: 67) en la activación de la ruta del complemento clásica como se ensaya por hemólisis de eritrocitos de oveja se investigó en presencia de suero humano (Innovative Research, Southfield, MI), de mono cynomolgus (Bioreclamation, Hicksville, NY) o de rata (Bioreclamation, Hicksville, NY). Estos ensayos se realizaron en suero altamente diluido, 0,1 % para ser humano y mono cynomolgus, y 0,3 % para rata, en las mismas condiciones que los usados para comparar los efectos inhibidores de ARC1905 frente a ARC672 en hemólisis de eritrocitos de oveja como se ha descrito inmediatamente antes. En una comparación paralela, podía conseguirse inhibición completa (90-99 %) de la actividad del complemento *in vitro* con ARC 1905 en sueros tanto humanos como de mono cynomolgus mientras que ARC1905 presentó poca o ninguna actividad inhibidora específica en la muestra de complemento de rata (Figura 59A). De forma similar a ARC658, ARC1905 era ~10 veces menos potente contra la actividad del complemento de cynomolgus en las condiciones del ensayo, como se refleja por los valores de CI_{90} y CI_{99} presentados en la Figura 59B.

Ensayos de Unión con Filtro de Nitrocelulosa. Se marcaron con ^{32}P aptámeros individuales en el extremo 5' por incubación con γ - ^{32}P -ATP y polinucleótido quinasa (New England Biolabs, Beverly, MA). El aptámero radiomarcado se separó por purificación de ATP libre por filtración en gel seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida. Para medir la afinidad del aptámero anti C5, se incubó aptámero radiomarcado (≤ 10 pM) con concentraciones crecientes

(0,05 - 100 nM) de proteína C5 purificada (Quidel, San Diego, CA) en solución salina tamponada con fosfato que contenía $MgCl_2$ 1 mM a temperatura ambiente (23 °C) y 37 °C, durante intervalos de tiempo de 15 minutos y 4 horas. Las reacciones de unión se analizaron por filtración con nitrocelulosa usando un colector de filtración en vacío de 96 pocillos, de transferencia puntual Minifold I (Schleicher & Schuell, Keene, NH). Se usó un medio de filtración de tres capas consistente (de arriba abajo) en nitrocelulosa Protran (Schleicher & Schuell), nylon Hybond-P (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y papel de transferencia de gel GB002 (Schleicher & Schuell). La capa de nitrocelulosa, que se une selectivamente a proteína frente a ácido nucleico, preferentemente conservó el aptámero anti C5 en complejo con un ligando proteico, mientras que el aptámero anti C5 no en complejo pasó a través de la nitrocelulosa y se adhirió al nylon. El papel de transferencia de gel se incluyó simplemente como un medio de soporte para los otros filtros. Después de la filtración, las capas de filtro se separaron, se secaron y se expusieron en una pantalla de fósforo (Amersham Biosciences) y se cuantificaron usando un sistema de formación de imágenes de transferencia Storm 860 Phosphorimager® (Amersham Biosciences).

Como se muestra en la Figura 9 y la Figura 10, las concentraciones crecientes de C5 potencian la proporción de ARC186 capturado en la membrana de nitrocelulosa. La dependencia del ARC186 unido en las concentraciones crecientes de C5 se describe bien por el modelo de unión de un único sitio ($C5 + ARC\ 186 \leftrightarrow C5 \cdot ARC186$; % unido = $C_{m\acute{a}x} / (1 + K_D / [C5])$; $C_{m\acute{a}x}$ es el % máximo unido a [C5] de saturación; K_D es la constante de disociación). Se muestran las curvas de unión de ARC186 a dos temperaturas después de una incubación de 15 minutos o 4 horas en las Figuras 9 y 10, respectivamente. Después de una incubación de 15 minutos, las curvas de unión de ARC186 a 23 y 37 °C son esencialmente indistinguibles dentro del error, ajustando con valores de K_D de 0,5 - 0,6 nM (Figura 9). Las diferencias entre las curvas de unión a 23 y 37 °C se hicieron más pronunciadas cuando se extendió el tiempo de incubación. Después de una incubación de 4 horas (Figura 10), la K_D observada a 23 °C se reduce a $0,08 \pm 0,01$ nM, mientras que la K_D observada a 37 °C permanece sin cambios ($0,6 \pm 0,1$ nM).

Para demostrar la base para el requisito de incubación larga a temperatura ambiente, se exploró adicionalmente la afinidad a esta temperatura usando métodos cinéticos. La velocidad de la reacción inversa que describe la disociación de $C5 \cdot ARC186$ es $v_{rev} = k_{-1}[C5 \cdot ARC186]$, en la que v_{rev} es la velocidad (unidades de $M\ min^{-1}$) y k_{-1} es la constante de velocidad de disociación de primer orden (unidades de min^{-1}). La velocidad de la reacción directa que describe la formación del complejo de $C5 \cdot ARC186$ es $v_{dir} = k_1[C5][ARC186]$, en la que v_{dir} es la velocidad (unidades de $M\ min^{-1}$) y k_1 es la constante de velocidad de asociación de segundo orden (unidades de $M^{-1}\ min^{-1}$). Los datos se analizaron usando la suposición de pseudo primer orden, en la que la concentración de un reactivo (C5 en este caso) se mantiene en amplio exceso sobre la otra ($[C5] \gg [ARC186]$), y por lo tanto permanece esencialmente sin cambios durante el transcurso de la reacción. En estas condiciones, la reacción directa se describe por la ecuación de velocidad para un proceso de primer orden, $v_{dir} = k_1'[ARC186]$, en la que $k_1' = k_1[C5]$.

Para analizar la disociación de $C5 \cdot ARC186$, se preequilibró ARC186 radiomarcado (≤ 10 pM) con proteína C5 5 nM en solución salina tamponada con fosfato que contenía $MgCl_2$ 1 mM a temperatura ambiente (23 °C). La reacción de disociación se inició por la adición de ARC186 no marcado (1 μ M), que actúa como una trampa para C5 libre, y se detuvo por la separación por filtración en nitrocelulosa de ARC186 radiomarcado unido libre. Se obtuvo un ciclo temporal de disociación de ARC186 variando la duración entre el inicio de la reacción de disociación y la filtración. El ciclo temporal de la disociación, observado como una reducción del porcentaje de ARC186 radiomarcado capturado en el filtro de nitrocelulosa (igual al porcentaje unido a C5), se describe bien por una desintegración exponencial sencilla en la que el % de ARC 186 unido = $100 \times e^{-k_{-1}t}$ (véase Figura 11). El valor de la constante de velocidad de disociación, k_{-1} , determinada por este método es $0,013 \pm 0,02\ min^{-1}$, correspondiente a una semivida ($t_{1/2} = \ln 2 / k_{-1}$) de 53 ± 8 min.

Para analizar la reacción de asociación, se midió la constante de velocidad en equilibrio (k_{eq}) para la formación de $C5 \cdot ARC186$ en presencia de diversas concentraciones de proteína C5 (1 - 5 nM). Se inició la formación del complejo mezclando entre sí proteína C5 y ARC186 radiomarcado en PBS que contenía $MgCl_2$ 1 mM a temperatura ambiente (23 °C), y se detuvo por separación por filtración en nitrocelulosa. Como se ha descrito para las reacciones de disociación, se obtuvo un ciclo temporal de formación de complejo variando la duración entre el inicio de la reacción y la filtración. El ciclo temporal de equilibrio, observado como un aumento en el porcentaje de ARC 186 radiomarcado capturado en el filtro de nitrocelulosa, se describe bien por una desintegración exponencial sencilla en la que el % de ARC186 unido = $100 \times (1 - e^{-k_{eq}t})$. Los ciclos temporales del equilibrio para C5 1, 2 y 4 nM se presentan en la Figura 12. Como se esperaba, el valor de k_{eq} aumenta linealmente con [C5] ($k_{eq}(1\ nM) = 0,19 \pm 0,02\ min^{-1}$; $k_{eq}(2\ nM) = 0,39 \pm 0,03\ min^{-1}$; $k_{eq}(3\ nM) = 0,59 \pm 0,05\ min^{-1}$; $k_{eq}(4\ nM) = 0,77 \pm 0,06\ min^{-1}$; $k_{eq}(5\ nM) = 0,88 \pm 0,06\ min^{-1}$). En las condiciones del experimento, la relación entre k_{eq} , k_1 y k_{-1} es $k_{eq} = k_1[C5] + k_{-1}$. Por lo tanto, se deriva una estimación de k_1 de la pendiente de una representación de k_{eq} frente a [C5] (véase inserto de la Figura 12), en este caso $0,18 \pm 0,01\ nM^{-1}min^{-1}$.

Estos datos indican que, en condiciones de baja concentración de C5 (por ejemplo, 0,1 nM), se requiere una incubación prolongada para que una mezcla de C5 y ARC 186 radiomarcado alcance el equilibrio. En estas condiciones, $k_{eq} = (0,18 \pm 0,01\ nM^{-1}\ min^{-1})(0,1\ nM) + 0,013\ min^{-1} = 0,03\ min^{-1}$, que corresponde a una semivida de 22 minutos. Por lo tanto, se requieren casi 2 horas de incubación a temperatura ambiente (~ 5 semividas) para el equilibrio completo (> 95 %). Un tiempo de incubación corto (por ejemplo 15 minutos) subestimar\á significativamente

la afinidad real del complejo, como se ha mostrado anteriormente por la diferencia de afinidades observada para una incubación de 15 minutos ($K_D = 0,5$ nM) frente a una de 4 horas ($K_D = 0,08$ nM). Puede calcularse una estimación alternativa de la K_D a temperatura ambiente a partir de los datos cinéticos de acuerdo con la relación $K_D = k_{-1} / k_1$. En este caso, la K_D calculada es de $0,07 \pm 0,01$ nM, que es completamente coherente con la K_D determinada anteriormente por métodos termodinámicos.

También se evaluó la especificidad de ARC186 (SEC ID N°: 4) para C5 en ensayos de filtración en nitrocelulosa por comparación con componentes del complemento tanto corriente arriba como corriente abajo de C5 en la cascada del complemento. Se obtuvieron proteínas humanas purificadas y complejos proteicos de Complement Technologies (Tyler, TX) incluyendo: C1q (cat. N° A099.18; $2,3$ μ M), C3 (cat. N° A113c.8; 27 μ M), C5 (cat. N° A120.14; $5,4$ μ M), C5a des Arg (cat. N° A145.6; 60 μ M), sC5b-9 (cat. N° A127.6; 1 μ M), factor B (cat. N° A135.12; 11 μ M) y factor H (cat. N° A137.13P; $6,8$ μ M). Se establecieron reacciones de unión realizando diluciones en serie de proteína en PBS más $MgCl_2$ 1 mM, BSA $0,02$ mg/ml y ARNt $0,002$ mg/ml, incubando durante 1-4 horas a 25 °C o 37 °C, y después se aplicaron al aparato de filtración en nitrocelulosa como se ha descrito anteriormente. Se determinaron las constantes de disociación K_D de representaciones semilogarítmicas del % de unión de nitrocelulosa frente a [C5] por un ajuste de los datos a la ecuación: % de unión de nitrocelulosa = amplitud \times [C5] / (K_D + [C5]).

Los resultados representados en la Figura 13 muestran que el aptámero esencialmente no reconoce C5a ($K_D \gg 3$ μ M), aunque presenta afinidad débil por C5b-9 soluble ($K_D > 0,2$ μ M), supuestamente debido a interacciones con el componente de C5b. Otros componentes del complemento presentan afinidad de moderada a débil para el aptámero. C3 no activado esencialmente no se une con el aptámero; sin embargo, el factor H ($K_D \sim 100$ nM) y, en mucho menor grado, C1q ($K_D > 0,3$ μ M) sí se une. Tomados juntos, los datos indican que ARC 186 (SEC ID N°: 4) se une con alta afinidad con C5 humano, principalmente mediante reconocimiento del dominio C5b. Por lo tanto, ARC 186 y sus derivados PEGilados, por ejemplo, ARC1905 no deberían interferir con la generación de C3b, que es importante para la opsonización bacteriana, o con el control innato de la activación de C³ por factores reguladores.

La conjugación de aptámeros con restos de PEG de alto peso molecular introduce la posibilidad de impedimento estérico que conduce a afinidad reducida. Los aptámeros modificados por PEG no se evalúan fácilmente con respecto a unión directa por ensayos de filtración de nitrocelulosa debido a la tendencia de estos aptámeros para adherirse a la nitrocelulosa incluso en ausencia de proteína diana. Sin embargo, las afinidades relativas de estos aptámeros pueden evaluarse a partir de su capacidad comparativa para competir con aptámero no PEGilado radiomarcado (≤ 10 pM) por la unión con la diana como se mide por filtración de nitrocelulosa conocida como ensayo de unión de competición, procesado a 37 °C. A medida que aumenta la concentración de competidor frío (es decir, no radiomarcado), el porcentaje de aptámero radiomarcado unido con la proteína diana se reduce. Como se muestra en la Figura 14, las concentraciones crecientes de ARC186 frío (SEC ID N°: 4) o aptámero PEGilado (ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC187 (SEC ID N°: 5)) ($0,05$ - 1000 nM) compiten fácilmente con ARC 186 radiomarcado (SEC ID N°: 4) con respecto a unión en presencia de proteína C5 2 nM. Adicionalmente, las curvas de valoración para los cuatro aptámeros casi se solapan, lo que indica que la conjugación de PEG en el caso de ARC657, ARC658 y ARC 187 tiene poco o ningún efecto en la afinidad del aptámero para C5.

En un estudio similar, el efecto de la conjugación de PEG en la unión con C5 se ensayó comparando ARC672 (ARC186 con una amina 5' terminal; SEC ID N° 63) con ARC1905 (ARC627 conjugado con un PEG de 40 kDa ramificado (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo)) usando el ensayo de unión competitiva. Se prepararon reservas de 10 μ M de cada aptámero en PBS más $MgCl_2$ 1 mM, BSA $0,01$ mg/ml, ARNt $0,002$ mg/ml y se diluyeron en serie para generar una serie de muestras $10X$ que abarcaban un intervalo > 100 veces de concentración de aptámero. Después se añadieron alícuotas de 12 μ l de cada muestra en una placa de 96 pocillos a 96 μ l de ARC186 radiomarcado con ^{32}P para generar una solución $1,1X$ de marcador y competidor frío. Se añadieron después 90 μ l de solución de marcador/competidor a 10 μ l de proteína C5 $10X$ para iniciar las reacciones. La concentración final de ARC186 radiomarcado en cada reacción se mantuvo constante. Las reacciones de unión se equilibraron durante 15 - 30 minutos a 37 °C, y después se filtraron en un aparato de filtro de nitrocelulosa descrito anteriormente. Para los fines del análisis de datos, se trataron aptámeros competidores fríos como inhibidores competitivos de la interacción ARC186/C5; el % de inhibición se calculó normalizando los datos para controlar las reacciones que carecían de competición (0 % de control de inhibición). Los valores de CI_{50} se determinaron a partir de representaciones semilogarítmicas del % de inhibición frente a [ARC672] o [ARC1905] por un ajuste de los datos a la ecuación: % de inhibición = amplitud \times [competidor]ⁿ / (CI_{50} ⁿ + [competidor]ⁿ).

Como se muestra en la Figura 60, la adición de un PEG de 40 kDa ramificado (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo) tuvo poco o ningún efecto en la afinidad de aptámero como se mide por unión competitiva. Los valores de K_D de $0,46 \pm 0,149$ nM y $0,71 \pm 0,130$ nM se aproximaron para ARC672 y ARC1905 respectivamente por la ordenada en el origen del ajuste de línea con la CI_{50} frente a los datos de C5 en la Figura 60. Ambos valores están cercanos a la K_D determinada para ARC186 a 37 °C.

La dependencia de temperatura de la interacción entre ARC 1905 y C5 también se estimó por ensayo de competición. Se diluyó en serie ARC1905 para generar series de muestras $10X$ como se ha descrito anteriormente. Las reacciones de unión se equilibraron durante 1 - 4 horas a 25 °C o 37 °C, y después se filtraron en el aparato de

filtro de nitrocelulosa. El porcentaje de inhibición se calculó normalizando los datos para reacciones de control sin competidor (0 % de control de inhibición) o sin proteína C5 (100 % de control de inhibición). Los valores de CI_{50} se determinaron a partir de representaciones semilogarítmicas del % de inhibición frente a [ARC672] o [ARC 1905] por un ajuste de los datos a la ecuación: % de inhibición = amplitud \times [competidor]ⁿ / (CI₅₀ⁿ + [competidor]ⁿ). Como se muestra en la Figura 61 ARC1905 se une con C5 con alta afinidad tanto a 25 °C como a 37 °C. Se obtuvieron valores de K_D de $0,15 \pm 0,048$ nM y $0,69 \pm 0,148$ nM a 25 °C y 37 °C, respectivamente, desde la ordenada en el origen de los datos de CI_{50} frente a C5. Ambos valores son coherentes con los valores de K_D determinados para la interacción de ARC186/C5 descrita anteriormente.

10 Ejemplo 1B: ensayo de sangre completa.

El efecto del aptámero anti C5 en la ruta alternativa del sistema del complemento se analizó usando el siguiente ensayo de sangre completa. En ausencia de un anticoagulante, se extrajo sangre de voluntarios humanos normales. Se incubaron alícuotas de sangre (que no contenían anticoagulante) con concentraciones crecientes de ARC186 (SEC ID N°: 4) durante 5 horas a temperatura ambiente o 37 °C. Las muestras se centrifugaron para aislar el suero y la presencia de C5b en el suero se detectó por ELISA de sC5b-9 (kit de ELISA de C5b-9, Quidel, San Diego, CA). Como se muestra en la Figura 15, la actividad anti complemento, como se refleja en la producción de C5b-9, entre muestras incubadas a temperaturas diferentes varió a 3 μ M. Los datos de temperatura ambiente indicaron que la concentración de aptámero requerida para inhibición cuantitativa está en el intervalo de 3-6 μ M, mientras que la concentración presentada de C5 es de aproximadamente 400 nM. Estos resultados sugieren que puede requerirse un exceso molar mayor de 10 veces de aptámero anti C5 (ARC186; SEC ID N°: 4) para la inhibición completa de la actividad de C5.

25 Ejemplo 1C: activación del complemento por zimosano.

El zimosano es un componente polisacárido de la pared celular de levadura, y un potente activador de la cascada del complemento alternativa. La adición de zimosano a muestras *ex vivo* de sangre, plasma o suero da como resultado la acumulación de productos de activación del complemento, incluyendo C5a y la versión soluble de C5b-9 (sC5b-9). Se realizaron adiciones a muestras de suero humano no diluido (Center for Blood Research, Boston, MA), suero de sangre completa humana citratado (Center for Blood Research, Boston, MA) o suero de cynomolgus (Charles River Labs, Wilmington, MA) de concentraciones crecientes de ARC658 (SEC ID N°: 62), el análogo de PEG de 30 K de ARC186 (SEC ID N°: 4). Para activar el complemento, se añadió zimosano (Sigma, St. Louis, MO) en una suspensión 10X a muestras a una concentración final de 5 mg/ml. Después de una incubación de 15 minutos a 37 °C, se retiraron partículas de zimosano por centrifugación y se determinó el alcance de la activación del complemento por ELISA de C5a y/o sC5b-9 (kit de ELISA de C5b-9, Quidel, San Diego, CA; kit de ELISA de C5a, BD Biosciences, San Diego, CA).

En ausencia de aptámero, el tratamiento con zimosano activa ~50 % de C5 de sangre completa o suero, en comparación con la activación de ~1 % en muestra no tratada. La adición de aptámero anti C5 hasta 50 nM (aproximadamente el 10 % de la concentración de C5 en sangre) tuvo poco efecto en la formación de sC5b-9. Sin embargo, la valoración adicional de C5 con concentraciones crecientes de ARC658 (SEC ID N°: 62) inhibió la activación de C5 de una manera dependiente de dosis como se ve en la Figura 16. En sangre completa o suero humano, se observó inhibición cuantitativa (~99 %) a 0,8 - 1 μ M de ARC658 (SEC ID N°: 62), correspondiente a ~2 equivalentes molares de aptámero para C5. Se necesitaban concentraciones mayores de aptámero para conseguir inhibición comparable en suero de cynomolgus. En este caso, se consiguió 99 % de inhibición solamente en presencia de aptámero 10 μ M, o ~20 equivalentes molares de aptámero para C5.

En un estudio similar, los efectos inhibidores de ARC1905 (la versión PEGilada de 40 kDa ramificada (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo) de ARC186) se ensayaron en muestras humanas y de mono cynomolgus usando el zimosano para activar el complemento mediante la ruta alternativa como sigue. Se proporcionó zimosano A de *Saccharomyces cerevisiae* por Sigma-Aldrich, Inc. (cat. N° Z4250-1G, St. Louis, MO). El zimosano A se proporcionó como un polvo y se resuspendió en PBS de Dulbecco (Gibco, Carlsbad, CA, cat. N° 14190-144) para producir una suspensión de 50 mg/ml. Se obtuvo suero humano normal congelado, agrupado (cat. N° IPLA-SER) de Innovative Research (Southfield, MI). Se obtuvo suero de macaco cynomolgus congelado, agrupado (cat. N° CYNSTRM) de Bioreclamation (Hicksville, NY). Se descongelaron frascos de 5 - 10 ml de suero proporcionados por el proveedor a 37 °C, se separaron en alícuotas (~1 ml) y se almacenaron a -20 °C. Las alícuotas se descongelaron según se necesitó justo antes de su uso por incubación a 37 °C y se almacenaron en hielo durante los experimentos. La concentración final de suero en cada ensayo fue de aproximadamente 100 %. Se preparó una reserva de 20 μ M de ARC1905 en solución salina 0,9 % y se diluyó en serie para generar una serie de muestras 10X que abarcaban un intervalo de ~90 veces de concentraciones de aptámero. También se incluyó una muestra sin aptámero (solamente solución salina) como un control negativo (0 % de inhibición).

Se aplicaron con pipeta 90 μ l de suero en pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos (VWR, cat. N° 1442-9596). Se diluyeron 10 μ l de muestra de aptámero directamente en el suero a temperatura ambiente y se mezclaron. Se aplicaron por pipeta 8 μ l de zimosano 50 mg/ml en pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos separados. Ambas

placas se preincubaron simultáneamente a 37 °C durante 15 minutos. Inmediatamente después de la preincubación, se añadieron 80 µl de la mezcla de suero/aptámero directamente a 8 µl de zimosano y se mezclaron, produciendo una concentración final de zimosano de 5 mg/ml. La placa de reacción se selló y se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Al final de la incubación, la reacción se detuvo pipeteando 8 µl de EDTA 0,5 M en los pocillos y mezclando. El zimosano se sedimentó por centrifugación (3700 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente) y se transfirieron ~80 µl de sobrenadante inactivado a una placa de PCR de 96 pocillos nueva y se selló. Los sobrenadantes se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C. Para controlar con respecto a la activación de fondo independiente de zimosano, se prepararon muestras de suero y se trataron exactamente como se ha descrito anteriormente, excepto que se añadieron 8 µl de solución salina en lugar de zimosano.

El alcance de la activación de C5 se determinó a partir de los niveles relativos de C5a generados en cada muestra activada por zimosano, como se mide por ELISA de C5a (ALPCO Diagnostics, Windham, NH, cat. N° EIA-3327) siguiendo el protocolo del kit de ELISA de C5a. El kit de ELISA de C5a incluye reactivos específicos humanos y se le da formato para análisis de C5a humano (hC5a) en muestras de plasma o suero. Fue por lo tanto necesario caracterizar la respuesta del ELISA para C5a de mono cynomolgus usando patrones de concentración de cynomolgus. Para preparar un conjunto de patrones adaptados, se incubaron alícuotas de 0,5 ml de suero humano o de mono cynomolgus con zimosano 5 mg/ml durante 15 minutos a 37 °C, se inactivó con 12,5 µl de EDTA 0,5 M y se centrifugó para retirar el zimosano. Se determinó que la concentración de C5a en la muestra de suero humano activada por zimosano era de aproximadamente 2 µg/ml de hC5a en comparación con plasmas convencionales de hC5a proporcionado con el kit. Se determinó que la concentración de C5a en la muestra de mono cynomolgus, expresada en equivalentes de C5a humanos (hC5a eq), era de aproximadamente 0,6 µg/ml de hC5a eq. Se preparó una serie de patrones que abarcaban un intervalo de 0,4 - 400 ng/ml de hC5a o 0,12 - 120 ng/ml de hC5a eq por dilución en suero de rata (que no interfiere con el ELISA). Se pretrataron patrones con un reactivo de precipitación de proteína como se indica en el protocolo del kit de ELISA y se aplicaron sin dilución adicional a la placa de ELISA. La placa de ELISA se leyó a una absorbancia máxima de 450 nm (A_{450}) usando un lector de placas de absorbancia UV/vis VersaMax (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). La A_{450} varió con la concentración de C5a de un mínimo de 0,1 - 0,2 a C5a bajo, alcanzando una meseta a ~3,5 a C5a alto. Para el fin de cuantificar C5a en muestras de ensayo, los límites superior e inferior de la cuantificación fueron, respectivamente, de 25 y 0,78 ng/ml de hC5a para ser humano y de 15 y 0,94 ng/ml de hC5a eq para mono cynomolgus. Se representó A_{450} frente a hC5a o hC5a eq ng/ml como se muestra en la Figura 62, y se obtuvo una curva patrón a partir de un ajuste de 4 parámetros para los datos usando la ecuación $\gamma = ((A - D)/(1 + (x/C)^B))^D + D$.

Justo antes del análisis de C5a, se pretrataron muestras de ensayo (incluyendo los controles solo con solución salina y sin zimosano) con reactivo de precipitación de proteínas, como se indica en el protocolo del kit de ELISA, después se diluyeron en serie en solución salina 0,9 %. Los niveles de C5a en muestras de ensayo no diluidas (incluyendo algunos de los controles no de zimosano) excedieron normalmente el límite superior de la cuantificación (ULOQ). Por lo tanto, se ensayaron diluciones de 1/5, 1/50 y 1/250 para acomodar la serie completa de concentración de C5a de la muestra de ensayo. Se cuantificaron los niveles de C5a por comparación con la curva patrón apropiada (humana o de mono cynomolgus) y se corrigieron con respecto a dilución. El % de inhibición a cada concentración de aptámero se calculó usando la ecuación $\% \text{ de inh} = 100 - 100 \times (C5a_{\text{muestra}} - C5a_{\text{sin zimosano}}) / (C5a_{\text{solo solución salina}} - C5a_{\text{sin zimosano}})$. Se determinaron los valores de CI_{50} a partir de una representación del % de inhibición frente a [ARC1905] usando la ecuación $\% \text{ de inh} = (\% \text{ de inh})_{\text{máximo}} \times [ARC1905]^n / (CI_{50}^n + [ARC1905]^n) + \text{fondo}$. Los valores de CI_{90} y CI_{99} se calcularon a partir de los valores de CI_{50} usando las ecuaciones $CI_{90} = CI_{50} \times [90/(100-90)]^{1/n}$ y $CI_{99} = CI_{50} \times [99/(100-99)]^{1/n}$.

El alcance de la activación de C3 (la etapa de la ruta del complemento común justo corriente arriba de C5) se determinó a partir de los niveles relativos de C3a generados en cada muestra activada por zimosano, como se mide por ELISA de C3a (kit de ELISA de C3a Becton-Dickinson OptiEIA, cat. N° 550499, Franklin Lakes, NJ) siguiendo el protocolo del kit de ELISA de C3a.

Justo antes del análisis de C3a, las muestras (incluyendo los controles solamente con solución salina o sin zimosano) se diluyeron en serie en solución salina al 0,9 %. El ELISA de C3a es más sensible que el de C5a; por lo tanto, fueron necesarias diluciones de 1/500, 1/5000 y 1/25.000 para acomodar la serie completa de concentraciones de C3a de muestra. Se usaron patrones del kit, derivados de suero humano, en lugar de los patrones adaptados preparados para análisis de C5a. Puesto que los niveles de C3a no variaron en gran medida, los patrones específicos de ser humano proporcionaron un indicio suficiente de sus niveles relativos.

Los datos generados a partir de ELISA tanto de C5a como de C3 se analizaron usando Microsoft Excel, y se representaron los % medios de los valores de inhibición usando Kaleidagraph (v. 3.51, Synergy Software). Se determinaron los valores de CI_{50} , CI_{90} y CI_{99} usando el programa adicional XLfit 4.1 de Excel. Los efectos comparativos de ARC1905 en activación del complemento humana y de mono cynomolgus, como se mide por este enfoque, se resumen en la Figura 63 y Figura 64. Como puede verse a partir de estas Figuras, puede conseguirse inhibición completa de la activación de C5 mediante la ruta alternativa *in vitro* con ARC1905 en sueros tanto humanos como de mono cynomolgus. En suero humano, la concentración de ARC1905 requerida para la inhibición del 90 % de la activación de C5 en una muestra no diluida fue de 442 ± 23 nM, aproximadamente equivalente a la

concentración molar media de C5. Sin embargo, ARC1905 fue 4 – 6 veces menos potente frente a actividad del complemento de mono cynomolgus en las condiciones del ensayo, como se refleja en los valores de CI_{90} y CI_{99} .

Los efectos de la activación de C3 de ARC1905, como se mide por los niveles de C3a, se resumen en la Figura 65. El fundamento para dirigirse específicamente al extremo final de la ruta del complemento es bloquear las funciones proinflamatorias de C5a y el complejo de ataque a membrana (MAC) sin comprometer las funciones de lucha contra el patógeno de los factores corriente arriba que culminan en la generación de C3a y C3b. Los datos de la Figura 65 demuestran que ARC1905, hasta 2 μ M, no inhibe la generación de C3a e indica que la activación del complemento corriente arriba no se ve afectada de forma negativa por ARC 1905. Se consiguió bloqueo esencialmente completo de la activación de C5 por ruta alternativa en muestras de suero tanto humano como de mono cynomolgus usando ARC1905. ARC1905 fue aproximadamente un orden de magnitud menos potente en la inhibición de la activación de C5 de mono cynomolgus que la activación de C5 humana en las condiciones de este ensayo. Sin desear quedar ligado a la teoría, el efecto inhibitor de ARC1905 en la activación del complemento es específico de C5 puesto que no se inhibió la activación de C3.

Ejemplo 1D: modelo de bucle de tubos de activación del complemento

Para ensayar la capacidad del aptámero anti C5 para bloquear la activación del complemento inducida por exposición a materiales ajenos, como se encuentra en el circuito de derivación cardiopulmonar, los inventores usaron el modelo de bucle de tubos descrito por Nilsson y colaboradores (Gong *et al.*, (1996) *Journal of Clinical Immunology* 16, 222-9; Nilsson *et al.*, (1998) *Blood* 92, 1661-7). Se cortó tubo quirúrgico/médico de Tygon S-50-HL (diámetro interno de 6,35 mm) (United States Plastic Corp. ((Lima, OH), cat. N° 00542)) en longitudes de aproximadamente 300 mm (volumen de aproximadamente 9 ml) y se llenaron con 5 ml de sangre de donante humano que contenía 0,4 unidades/ml de heparina (Celsus) y diversas concentraciones de ARC658 (SEC ID N°: 62) (0 - 5 μ M). Cada tramo de tubo de Tygon se cerró en un bucle con secciones cortas (~ 50 mm) de tubo adaptador de silicona no quirúrgica (diámetro interno de 9,53 mm) (United States Plastic Corp. (formulación R-3603, cat. N° 00271)) como se describe en Gong *et al.* Los bucles de tubos se rotaron durante 1 hora a aproximadamente 30 rpm en un baño de agua a 37 °C. Los contenidos del bucle se vertieron después en tubos cónicos de polipropileno que contenían EDTA (concentración final de 10 mM) para interrumpir la activación del complemento. Se aisló plasma pobre en plaquetas por centrifugación y se analizó con respecto a C5a y C3a por ELISA (kit de ELISA de C3a, Quidel, San Diego, CA; kit de ELISA de C5a, BD Biosciences, San Diego, CA).

La activación total del complemento en ausencia del aptámero fue pequeña en comparación con el ensayo de zimosano. Normalmente, los niveles de C5a aumentaron en aproximadamente 6 ng/ml después de la incubación de 1 hora, correspondiente a la activación de <1 % de C5 disponible. No obstante, este aumento fue reproducible y se inhibió por valoración con ARC658 (SEC ID N°: 62). Como se muestra en la Figura 17, el ARC658 300 - 400 nM (SEC ID N°: 62) fue suficiente para conseguir 99 % de inhibición de la activación de C5, un nivel que es aproximadamente equivalente o ligeramente menor que la concentración molar de C5 en sangre. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, aunque se requiere menos aptámero para obtener el 99 % de inhibición de la activación de C5 en este modelo que en el modelo de zimosano, esta observación pudo reflejar las diferencias sustanciales en el estímulo activador del complemento usado en los dos ensayos. También se controló la generación de C3a como un control para verificar que ARC658 (SEC ID N°: 62) no bloqueaba las etapas de activación antes que C5 en la cascada del complemento. Los niveles de C3a aumentaron en aproximadamente 4000 ng/ml después de la incubación de 1 hora, correspondiente a la activación de aproximadamente 10 % del C3 disponible. A diferencia de la generación de C5a, se observó poca inhibición dependiente de dosis de la generación de C3a tras la valoración con ARC658 (SEC ID N°: 62) lo que demuestra que ARC658 (SEC ID N°: 62) bloquea específicamente la escisión de C5.

El estudio de modelo de bucle de tubo se repitió con el ARC 1905 de aptámero anti C5 (SEC ID N° 67). Se diluyó en serie ARC1905 en solución salina 0,9 % para generar una serie de muestras 20X que abarcaba un intervalo de concentraciones de aptámero de 100 veces (10 - 1000 nM final en el ensayo). Se incluyeron muestras que contenían aptámero irrelevante (ARC127) para controlar con respecto a efectos oligonucleotídicos no específicos. También se incluyó una muestra sin aptámero (solamente solución salina) como un control negativo. Se extrajeron muestras de sangre de un único donante por métodos de flebotomía convencional de voluntarios internos. Se extrajo sangre completa de 5 donantes separados directamente en una jeringa de 60 ml (Becton-Dickinson, (Franklin Lakes, NJ), cat. N° 309653) y se separó en alícuota inmediatamente en bivalirudina (20 μ M final) (Prospec-Tany Technogene Ltd., (Israel), lote N° 105BIV01) +/- aptámero. Se usó el anticoagulante bivalirudina, un inhibidor directo de la trombina, en lugar de heparina que interfiere con la activación del complemento.

Se realizó el modelo de bucle de tubos esencialmente como se ha descrito inmediatamente antes. Se llenaron secciones de ~300 mm de tubo (diámetro de 6,35 mm, volumen de ~9 ml) con 5 ml de muestras de sangre/aptámero/bivalirudina inmediatamente después de que se hubiera extraído la sangre del donante. Los tubos se unieron después con seguridad en bucles con secciones cortas (~50 mm) de tubos adaptadores de silicona, produciendo un volumen de gas de ~4 ml. Los bucles de tubos se rotaron verticalmente a 32 rpm durante la incubación en un baño de agua a 37 °C durante 1 hora. Después de la incubación, los 5 ml de muestra se

transfirieron a un tubo cónico de 15 ml (Coming, (Coming, NY), cat. N° 430766), que contenía 100 µl de EDTA 0,5 M, proporcionando una concentración de EDTA final de 10 mM. Se recogió 1 ml de sobrenadante de plasma de cada muestra interrumpida después de centrifugación (Centrífuga Eppendorf 5804) a 4 °C (3.300 rpm, 20 minutos). Los sobrenadantes se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C. Para controlar con respecto a la activación de fondo, se preparó una muestra pre CPB añadiendo 5 ml de sangre nueva directamente a un tubo cónico de 15 ml en hielo que contenía 100 µl de EDTA 0,5 M. Esta muestra se procesó con respecto a plasma y se almacenó como se ha descrito anteriormente.

El alcance de la activación de C5 se determinó a partir de los niveles relativos de C5a generados en cada muestra activada, como se mide por ELISA de C5a como se ha descrito inmediatamente antes. El ELISA de C5a se realizó en muestras de plasma no diluidas de acuerdo con el protocolo del kit de ELISA y se cuantificaron los niveles de C5a en la muestra por comparación con los patrones de C5a proporcionados por el fabricante. El % de inhibición de la generación de C5a a cada concentración de aptámero se calculó usando la ecuación $\% \text{ de inh} = 100 - 100 \times (C5a_{\text{muestra}} - C5a_{\text{pre CPB}}) / (C5a_{\text{solamente solución salina}} - C5a_{\text{pre CPB}})$. Los valores de CI_{50} se determinaron a partir de una concentración del % de inhibición frente a [ARC1905] usando la ecuación $\% \text{ de inh} = (\% \text{ de inh})_{\text{máximo}} \times [ARC1905]^n / (CI_{50}^n + [ARC1905]^n) + \text{fondo}$. Los valores de CI_{90} y CI_{99} se calcularon a partir de los valores de CI_{50} usando las ecuaciones $CI_{90} = CI_{50} \times [90 / (100 - 90)]^{1/n}$ y $CI_{99} = CI_{50} \times [99 / (100 - 99)]^{1/n}$.

El alcance de la activación de C3 se determinó a partir de los niveles relativos de C3a generados en cada muestra activada, como se mide por ELISA de C3a como se ha descrito inmediatamente antes. Justo antes del análisis de C3a, las muestras (incluyendo los controles de solamente solución salina y pre CPB) se diluyeron en serie en solución salina al 0,9 %. El ELISA de C3a es más sensible que el de C5a; por lo tanto, fue necesaria una dilución de 1/5000 para acomodar la serie de concentraciones de G3a de la muestra. Los niveles de C3a de la muestra se cuantificaron por comparación con patrones del kit, y el % de inhibición se calculó como se ha descrito para C5a. Los datos se analizaron usando Microsoft Excel, y el % medio de los valores de inhibición se representó usando Kaleidagraph (v3.5 Synergy Software). Los valores de CI_{50} , CI_{90} y CI_{99} se determinaron usando el programa adicional XLfit 4.1 de Excel.

Los efectos medios de ARC1905 y el aptámero irrelevante ARC127, en la activación del complemento en los cinco donantes se resume en la Figura 66. Como se muestra en la Figura 67 se consiguió bloqueo completo de la activación de C5, como se refleja en la generación de C5a con ARC 1905 <500 nM. Mientras que el aptámero irrelevante no tuvo efecto inhibitor hasta 1 µM. Los valores de CI_{50} , CI_{90} y CI_{99} de sangre completa medios fueron de $119 \pm 28,6$ nM, $268 \pm 39,2$ nM y 694 ± 241 nM, respectivamente (Figura 66). Sin desear quedar ligado a la teoría, es razonable asumir que se excluye ARC1905 del volumen sanguíneo celular, que comprende aproximadamente 45 % del total. Los valores de CI_{50} , CI_{90} y CI_{99} , ajustados para reflejar la inhibición de C5 en plasma, por lo tanto, fueron de $216 \pm 52,0$ nM, 487 ± 71 nM y 1261 ± 438 nM. Estos valores son coherentes con los parámetros calculados para la inhibición por ARC1905 de la activación del complemento inducida por zimosano en suero lo que sugiere que los componentes sanguíneos celulares no interfieren significativamente con la actividad anti C5 de ARC1905. La generación de C3a no se vio inhibida por ARC1905 o aptámero irrelevante hasta 1 µM. Sin desear quedar ligado a la teoría, esto sugiere que ARC1905 ni inhibe la reacción de C3 convertasa, ni bloquea otras etapas que contribuyen a la activación de cascada alternativa tal como deposición de C3 y ensamblaje de convertasa.

EJEMPLO 2

Selecciones *De Novo* y secuencias

Selección de C5 con grupo dRmY

Se realizaron dos selecciones para identificar aptámeros de dRmY para proteína C5 de longitud completa humana. La proteína C5 (Quidel Corporation, San Diego, CA o Advanced Research Technologies, San Diego, CA) se usó en forma de longitud completa ("FL") y parcialmente tripsinizada ("TP") y ambas selecciones fueron selecciones directas contra las dianas proteicas que se habían inmovilizado en una placa hidrofóbica. Ambas selecciones produjeron grupos enriquecidos significativamente con respecto a unión de C5 de longitud completa frente a grupo no seleccionado, sin tratamiento. Todas las secuencias mostradas en el presente ejemplo se muestran 5' a 3'.

Preparación de grupos: se sintetizó un molde de ADN con la secuencia

TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTACN₍₃₀₎GGTCG ATCGATCGATCATCGATG
(ARC520; SEC ID N°: 70) usando un sintetizador de ADN ABI EXPEDITE™, y se desprotegió por métodos convencionales. Los moldes se amplificaron con el cebador 5'
TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC (SEC ID N°: 71) y el cebador 3'
CATCGATGATCGATCGATCGACC (SEC ID N°: 72) y después se usó como un molde para transcripción *in vitro* con ARN polimerasa T7 mutante simple Y639F. Se realizaron transcripciones usando HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, TritonX-100 0,01 %, PEG-8000 10 %, MgCl₂ 9,5 mM, MnCl₂ 2,9 mM, NTP 2 mM, GMP 2 mM, espermina 2 mM, pirofosfatasa inorgánica 0,01 unidades/µl y polimerasa T7 mutante simple Y639F.

Selección: en el ciclo 1, se realizó una etapa de selección positiva en columnas de unión de filtro de nitrocelulosa. Brevemente, se incubaron 1×10^{15} (0,5 nmoles) de ARN agrupado en 100 μ l de tampón de unión (DPBS 1X) con C5 de longitud completa 3 μ M o C5 parcialmente tripsinizado 2,6 μ M durante 1 hora a temperatura ambiente. Se separaron los complejos ARN:proteína y las moléculas de ARN libres usando columnas de centrifugación de nitrocelulosa de 0,45 μ m de Schleicher & Schuell (Keene, NH). Las columnas se prelavaron con 1 ml de DPBS 1X, y después se añadieron las soluciones que contenían ARN:proteína a las columnas y se centrifugaron en una centrífuga a 1500 g durante 2 minutos. Se realizaron tres lavados de tampón de 1 ml para retirar agentes de unión no específicos de los filtros, después los complejos de ARN:proteína unidos a los filtros se eluyeron dos veces con lavados de 200 μ l de tampón de elución (urea 7 M, acetato sódico 100 mM, EDTA 3 mM precalentado a 95 °C). El ARN eluido se precipitó (2 μ l de glicógeno, 1 volumen de isopropanol, ½ volumen de etanol). El ARN se transcribió de forma inversa con el sistema ThermoScript RT-PCR™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando el cebador 3' descrito anteriormente SEC ID N°: 72, seguido de amplificación por PCR (Tris 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, cebadores 0,5 μ M SEC ID N°: 71 y SEC ID N°: 72, 0,5 mM de cada dNTP, 0,05 unidades/ μ l de Taq polimerasa (New England Biolabs, Beverly, MA)). Los moldes de PCR se purificaron usando columnas Centriprep (Princeton Separations, Princeton, NJ) y se usaron para transcribir el grupo del siguiente ciclo.

En ciclos posteriores de selección, se realizó separación de ARN unido y libre en placas hidrofóbicas Nunc Maxisorp (Nunc, Rochester, NY). El ciclo se inició inmovilizando 20 pmoles tanto de C5 de longitud completa como de C5 parcialmente tripsinizado en la superficie de la placa durante 1 hora a temperatura ambiente en 100 μ l de DPBS 1X. El sobrenadante se retiró después y los pocillos se lavaron 4 veces con 120 μ l de tampón de lavado (DPBS 1X). Los pocillos de proteínas se bloquearon después con un tampón de PBS 1X que contenía ARNt de levadura 0,1 mg/ml y ADN de esperma de salmón 0,1 mg/ml como competidores. La concentración del grupo usada fue siempre al menos en exceso de cinco veces de la concentración de proteína. El ARN del grupo también se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en pocillos vacíos para retirar cualquier secuencia unida al plástico, y después se incubó en un pocillo bloqueado sin proteína para retirar cualquier secuencia de unión competidora del grupo antes de la etapa de selección positiva. El ARN del grupo se incubó después durante 1 hora a temperatura ambiente y el ARN unido al C5 inmovilizado se transcribió de forma inversa directamente en la placa de selección mediante la adición de mezcla de RT (cebador 3', SEC ID N°:72 y RT ThermoScript, Invitrogen) seguido de incubación a 65 °C durante 1 hora. El ADNc resultante se usó como un molde para PCR (Taq polimerasa, New England Biolabs). El ADN molde del grupo amplificado se desaló con una columna Centriprep (Princeton Separations) de acuerdo con las condiciones recomendadas del fabricante y se usó para programar la transcripción del ARN del grupo para el siguiente ciclo de selección. El grupo transcrito se purificó en gel en un gel de poli(acrilamida) al 10 % en cada ciclo.

El progreso de selección se controló usando un ensayo de unión de filtro de tipo sándwich (transferencia puntual). El ARN del grupo marcado con 5'-³²P (concentración traza) se incubó con C5, DPBS 1X más ARNt 0,1 mg/ml y ADN de esperma de salmón 0,1 mg/ml, durante 30 minutos a temperatura ambiente, y después se aplicó a un filtro de tipo sándwich de nitrocelulosa y nylon en un aparato de transferencia puntual (Schleicher y Schuell). El porcentaje de ARN de grupo unido a la nitrocelulosa se calculó y se controló aproximadamente cada 3 ciclos con una única exploración puntual (C5 +/-300 nM). Se realizaron mediciones de K_d del grupo usando una valoración de proteína y el aparato de transferencia puntual como se ha descrito anteriormente.

Datos de selección: ambas selecciones se enriquecieron después de 10 ciclos sobre el grupo sin tratamiento previo. Véase Figura 18. En el ciclo 10, la K_d del grupo fue de aproximadamente 115 nM para la longitud completa y 150 nM para la selección tripsinizada, pero el alcance de la unión fue de solamente aproximadamente el 10 % en la meseta en ambos. Los grupos R10 se clonaron usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) y se secuenciaron.

Información de secuencia: se secuenciaron 45 clones de cada grupo. El grupo de longitud completa de R10 estaba dominado por un clon individual ARC913 (SEC ID N°: 75) que componía el 24 % del grupo, 2 conjuntos de duplicados y secuencias individuales componían el resto. El grupo tripsinizado R10 contenía 8 copias del ARC913 de la misma secuencia (SEC ID N°: 75), pero el grupo estaba dominado por otra secuencia (AMX221.A7; 46 %). El clon ARC913 (SEC ID N°: 75) tenía una K_d de aproximadamente 140 nM y el alcance de la unión fue hasta el 20 %. Véase Figura 19.

La secuencia individual enumerada en la Tabla 5 se enumera en la dirección 5' a 3', y representa la secuencia de ribonucleótidos del aptámero que se seleccionó en las condiciones de dRmY SELEX™ proporcionadas. Las realizaciones de la invención derivadas de esta selección (y como se refleja en el listado de secuencias) las purinas (A y G) son desoxi y las pirimidinas (U y C) son 2'-OMe. La secuencia enumerada en la Tabla 5 puede contener o no recubrimiento terminal (por ejemplo, una dT invertida 3'). La secuencia única del aptámero posterior comienza en el nucleótido 23, inmediatamente después de la secuencia fija GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEC ID N°: 73), y continúa hasta que se encuentra con la secuencia de ácido nucleico fija 3' GGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG (SEC ID N°: 74)

Tabla 5: secuencia de nucleótidos del aptámero dRmY de C5

ARC913 (SEC ID N°: 75)
 GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUUGGCACAGGCAUACAUAACGCAGGGGUCGAUCGA
 UCGAUCAUCGAUG

5 **Ensayo de hemólisis:** el efecto de ARC913 (SEC ID N°: 75) en la ruta clásica del sistema del complemento se analizó usando un ensayo de hemólisis previamente descrito, en comparación con el grupo tanto de ARC186 (SEC ID N°: 4) (aptámero anti C5, control positivo) como de dRmY no seleccionado (control negativo). En el ensayo de inhibición hemolítica, se mezcló una solución de suero humano completo al 0,2 % con eritrocitos de oveja recubiertos con anticuerpos (Ensayo de CH50 del Complemento Diamedix EZ, Diamedix Corporation, Miami, FL) en presencia de ARC913 valorado (SEC ID N°: 75). El ensayo se realizó en solución salina tamponada con veronal que contenía calcio, magnesio y gelatina 1 % (tampón de complemento GVB⁺⁺) y se incubó durante 1 hora a 25 °C. Después de la incubación las muestras se centrifugaron. Se leyó la densidad óptica a 415 nm (DO₄₁₅) del sobrenadante. La inhibición de la actividad de hemólisis se expresa como % de la actividad de hemólisis en comparación con el control. Véase Figura 20. Se calculó que la CI₅₀ del aptámero era de aproximadamente 30 nM.

EJEMPLO 3

Composición y optimización de secuencia

Ejemplo 3A: minimización de ARC913:

Se transcribieron seis construcciones basadas en ARC913 (SEC ID N°: 75), se purificaron en el, y se ensayaron en transferencias puntuales con respecto a unión con C5. ARC954 era similar al clon parental con una K_d de 130 nM y alcance de unión al 20 %, mientras que ARC874 (SEC ID N°: 76) era el único otro clon que se unía con C5 con una K_d de 1 μM.

Las secuencias individuales enumeradas en la Tabla 6 se enumeran en la dirección 5' a 3' y derivaron de aptámeros que se seleccionaron en las condiciones de SELEX dRmY proporcionadas. En las realizaciones de la invención derivadas de esta selección (y como se refleja en el listado de secuencias) las purinas (A y G) son desoxi y las pirimidinas (U y C) son 2'-OMe. Cada una de las secuencias enumeradas en la Tabla 6 puede contener o no recubrimiento terminal (por ejemplo, un dT invertido 3').

Tabla 6. Secuencias de nucleótidos de clones minimizados de ARC913

ARC874 (SEC ID N°: 76)
 CCUUGGUUUUGGCACAGGCAUACAUAACGCAGGG
ARC875 (SEC ID N°: 77)
 CCUUGGUUUUGGCACAGGCAUACAAACGCAGGG
ARC876 (SEC ID N°: 78)
 GGGUUUGGCACAGGCAUACAUAACCC
ARC877 (SEC ID N°: 79)
 GGGUUUGGCACAGGCAUACAAACCC
ARC878 (SEC ID N°: 80)
 GGCGGCACAGGCAUACAUAACGCAGGGGUCGCC
ARC954 (SEC ID N°: 81)
 CGUUCUACCUUGGUUUUGGCACAGGCAUACAUAACGCAGGGGUCGAUCG

Ejemplo 3B: optimización de ARC913: reselección dopada

Tanto para optimizar la afinidad de unión del clon ARC913 (SEC ID N°: 75) por C5 como para determinar los elementos de unión claves, se realizó una reselección dopada. Las reselecciones dopadas se usan para explorar los requisitos de secuencia dentro de un clon activo o mínimo. Se llevan a cabo selecciones con un grupo sintético, degenerado, que se ha diseñado basándose en una única secuencia. El nivel de degeneración habitualmente varía del 70 % al 85 % de nucleótidos de tipo silvestre. En general, se observan mutaciones neutrales pero en algunos casos los cambios de secuencia pueden dar como resultado mejoras de la afinidad. La información de secuencia compuesta puede usarse después para identificar el motivo de unión mínimo y ayudar a intentos de optimización.

Preparación de grupos: la secuencia molde

taataccgactcactataGGGAGAGGAGAGAACGTTCTACN₍₃₀₎GTTACGACTAGCATCGATG (SEC ID N°: 82) se basó en ARC913 (SEC ID N°: 75) y se sintetizó originándose cada resto de la región aleatoria dopada a un nivel del 15 %, es decir en cada posición aleatoria ("N"), el resto tiene una probabilidad del 85 % de ser el nucleótido hallado en la secuencia de tipo silvestre CTTGTTTGGCACAGGCATACATACGCAGGGGTCGATCG (SEC ID N°: 83) y un 15 %

de probabilidades de ser uno de los otros tres nucleótidos.

5 El molde y el grupo de ARN para la reelección dopada se prepararon esencialmente como se ha descrito anteriormente. Los moldes se amplificaron con los cebadores taatcgactcactataGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC (SEC ID N°: 84) y CATCGATGCTAGTCGTAAC (SEC ID N°: 85). Se realizaron dos selecciones con C5 de longitud completa, usando una selección una concentración mayor de sal en la etapa de lavado. Se llevó a cabo el protocolo de selección como se ha descrito anteriormente, con dos excepciones: 1) el ciclo 1 se realizó en placas hidrofóbicas (así como todos los ciclos posteriores) con solamente una etapa positiva; y 2) no se usó competidor en absoluto durante la selección. La concentración de C5 y concentración de grupo de ARN se mantuvieron constantes a 200 nM y 1 μ M respectivamente.

10 **Datos de reelección dopada.** Las selecciones de salinidad tanto normal como alta se enriquecieron después de 5 ciclos sobre el grupo sin tratamiento previo. En el ciclo 5 la K_d del grupo fue de aproximadamente 165 nM para la selección de alta salinidad y 175 nM para la selección de salinidad normal. El alcance de la unión fue de aproximadamente el 20 % en la meseta en ambos. Los grupos de R4 se clonaron usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se secuenciaron 48 clones de cada grupo. Se transcribieron 12 clones de cada grupo y se ensayaron en un ensayo de transferencia puntual de un único punto a 500 nM de C5. Las constantes de disociación (K_d) se midieron de nuevo usando el ensayo de transferencia puntual previamente descrito. Se estimaron las K_d para los 11 mejores clones identificados en la exploración puntual individual, ajustando los datos a la ecuación: fracción de ARN unido = $\text{amplitud} * K_d / (K_d + [C5])$. Los clones con las tres mejores K_d fueron SEC ID N°: 91 (73 nM), SEC ID N°: 96 (84 nM) y SEC ID N°: 95 (92 nM). Las secuencias para estos 11 clones se enumeran posteriormente en la Tabla 7.

15 Las secuencias enumeradas en la Tabla 7 se enumeran en la dirección 5' a 3' y representan las secuencias de nucleótidos de los aptámeros que se seleccionaron en las condiciones de SELEX dRmY proporcionadas. En las realizaciones de la invención derivadas de esta selección (y como se refleja en el listado de secuencias), las secuencias correspondientes comprenden las combinaciones de dRmY de los restos, como se indica en el texto, en las que las purinas (A y G) son desoxi y las pirimidinas (U y C) son 2'-OMe. Cada una de las secuencias enumeradas en la Tabla 7 puede contener o no recubrimiento terminal (por ejemplo, un dT invertido 3'). Las secuencias únicas de cada uno de los aptámeros posteriores comienza en el nucleótido 23, inmediatamente después de la secuencia fija 5' GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEC ID N°: 86), y continúa hasta que se encuentra con la secuencia de ácido nucleico fija 3' GUUACGACUAGCAUCGAUG (SEC ID N°: 87).

ES 2 449 047 T3

Tabla 7 secuencias de nucleótidos de clones de reselección dopada

(SEC ID N°: 88)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGAUCGGUUACGACUAGCAUCGA
UG

5 (SEC ID N°: 89)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGUGUCGAUCUGUUACGACUAGCAUCGA
UG

(SEC ID N°: 90)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUAAAUACGCAGGGUCGAUCGGUUACGACUAGCAUCGA
UG

(SEC ID N°: 91)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCCAGGCAUUAUACGCAGGGAUUGAUCCGUUACGACUAGCAUCGA
UG

10 (SEC ID N°: 92)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCGCAGGCAUACAUACGCAGGUCGAUCGGUUACGACUAGCAUCGAUG

(SEC ID N°: 93)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGCCAACCCUACGCACGGAUUCGCCCGUUACGACUAGCAUCGA
UG

15 (SEC ID N°: 94)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGUCGAUCGGUUACGACUA

(SEC ID N°: 95)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUAGGUUCGCACUGUCAUACAUACACACGGGCAAUCGGUUACGACUAGCAUCGAU
G

20 (SEC ID N°: 96)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCNCAGGCAUANAUACGCACGGGUCGAUCGGUUACGACUAGCAU

(SEC ID N°: 97)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUUCUCUGCCACAAGCAUACCUUCGCGGGGUUCUAUUGGUUACGACUAGCAUCGA
UG

(SEC ID N°: 98)
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUUAUACGCAGGGUCGAUCGGUUACGACUAGCAUCGAU
G

Ejemplo 3C: modificación con PEG ramificado de 40 kDa de ARC186

El oligonucleótido 5' NH₂-fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGnWnGfUfCfUmGmAmGfUfUAfCfCfUmGfCmG-3' (ARC672, SEC ID N°: 63) se sintetizó en un sintetizador de ADN Expedite (ABI, Foster City, CA) de acuerdo con los procedimientos recomendados del fabricante usando ARN 2'-OMe, ARN 2'-F y fosforamiditas de ARN protegido con TBDMS disponibles en el mercado convencionales (Glen Research, Sterling, VA) y un apoyo de CPG de desoxitimidina invertido. Se unió la función amino terminal con un modificador 5'-amino, 6-(trifluoroacetilamino) hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita, C6-TFA (Glen Research, Sterling, VA). Después de la desprotección, los oligonucleótidos se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en resina Super Q 5PW (30) (Tosoh Biosciences) y se precipitaron con etanol.

El aptámero modificado con amina se conjugó con diferentes restos de PEG de forma postsintética. El aptámero se disolvió en una solución de agua/DMSO (1:1) a una concentración entre 1,5 y 3 mM. Se añadió tampón de carbonato sódico, pH 8,5, a una concentración final de 100 mM, y el oligo se hizo reaccionar durante una noche con un exceso molar de 1,7 del reactivo de PEG deseado (por ejemplo p-nitrofenil carbonato éster GL2-400NP Sunbright de 40 kDa de ARC1905 [NOF Corp, Japón], o mPEG2-NHS éster de 40 kDa de ARC187 [Nektar, Huntsville AL]) disuelto en un volumen igual de acetonitrilo. Los productos resultantes se purificaron por cromatografía de intercambio iónico en resina Super Q 5PW (30) (Tosoh Biosciences), y se desalaron usando cromatografía de fase inversa realizada en resina Amberchrom CG300-S (Rohm y Haas) y se liofilizaron. La estructura de ARC 187 (SEC ID N°: 5) se muestra en la Figura 21 mientras que la estructura de ARC1905 (SEC ID N°: 67) se muestra en la Figura 22.

EJEMPLO 4**Modelo de corazón perfundido aislado**Ejemplo 4A: prueba de principios con ARC186

La concentración media del componente del complemento C5 en el plasma humano es de aproximadamente 500 nM. Tras la exposición de corazones de ratón aislados perfundidos con tampón de Krebs Heinsleit a plasma humano 6 %, se activa la cascada del complemento humano, lo que conduce a escisión de C5 en C5a y C5b. El componente C5b forma posteriormente un complejo con los componentes del complemento C6, C7, C8 y C9 también conocidos como el "complejo de ataque a membrana" ("MAC" o C5b-9) que daña vasos sanguíneos cardíacos y miocitos cardíacos, conduciendo de este modo a disfunción miocárdica (presión diastólica final aumentada, arritmias) y asistolia (Evans *et al.*, Molecular Immunology, 32, 1183-1195 (1995)). Previamente, se ensayaron anticuerpos monoclonales y de cadena sencilla que bloquean la escisión de C5 humana (Pexelizumab o una versión de scFv de cadena sencilla de Pexelizumab) en este modelo y se mostró que inhibían el daño y la disfunción miocárdicos (Evans *et al.*, 1995).

Este modelo se usó para establecer que el aptámero de bloqueo de C5 ARC186 (SEC ID N°: 4), como Pexelizumab, inhibía el daño del complemento mediado por C5 humano a corazones de ratón perfundidos aislados. Se obtuvieron ratones C57 B1/6 de Charles River Laboratories, (Wilmington, MA). Brevemente, después de la inducción de anestesia profunda, cada corazón de ratón se retiró y se montó en una aguja roma insertada en la aorta, a través de la cual se perfundió continuamente el corazón con tampón de Krebs Heinsleit. Se insertó un transductor de presión (Mouse Specifics, Boston, MA) en el ventrículo izquierdo permitiendo la medición continua de la frecuencia cardíaca y la presión intraventricular. Después de un periodo de equilibrio de 15 minutos durante el que se tomaron mediciones de línea basal, los corazones se perfundieron posteriormente con tampón y plasma humano al 6 % +/- aptámero a diversas concentraciones (Véase Figura 23). Durante estos estudios y como se describe en Evans *et al.*, los inventores demostraron que los corazones que se perfundían con tampón de Krebs Heinsleit + plasma humano 6 % experimentaron insuficiencia en un periodo de 5 minutos después de añadir el plasma al perfundido, mientras que los corazones que se perfundían continuamente solamente con tampón continuaron latiendo más de dos horas. Por lo tanto, la longitud de cada experimento se definió de forma arbitraria como 15 minutos. Se presenta el esquema de este estudio con ARC186 en la Figura 23.

Se controló la presión intraventricular y se registró continuamente dando como resultado un seguimiento de la onda de presión (Figuras 24 y 25). El punto de desviación más bajo representa la presión diastólica final ("EDP") y el punto de desviación más alto representa la presión sistólica ("SP"). Las ondas de presión de línea basal aparecen a la izquierda de la línea negra vertical marcada "0" mostrada en cada seguimiento. Como se ha publicado previamente (Evans *et al.*, 1995), los corazones perfundidos con plasma humano 6 % experimentaron un rápido aumento de la presión diastólica final ventricular izquierda, culminando en última instancia en asistolia (el corazón se detiene) en un periodo de 5 minutos (Figura 24). Cuando se añadió aptámero irrelevante al plasma humano en un exceso molar de 50 veces, también se observó aumento de EDP y asistolia (Figura 24).

Cuando se añadió ARC186 al sistema en equivalencia molar, también hubo un aumento precipitado de la EDP, culminando en asistolia (Figura 25). En los tres grupos de corazones que experimentaron daño mediado por complemento, el aumento de la EDP y la asistolia, el corazón estaba visiblemente edematoso y turgente al final del

experimento. Cuando se añadió ARC186 al plasma en un exceso molar de 10 veces o 50 veces (Figura 25), las sondas de presión ventricular permanecieron normales y no se observó asistolia. Además, el edema y la turgencia previamente descritos no resultaron evidentes en estos grupos.

5 Durante cada experimento, la frecuencia cardíaca se registró a intervalos de 5 minutos, y la frecuencia cardíaca media para el grupo durante cada intervalo se representó gráficamente. Como se muestra en la Figura 26 los corazones perfundidos sin aptámero o con aptámero irrelevante desarrollaron asistolia rápidamente, habitualmente en un periodo de 5 minutos. El ARC186 añadido al sistema a equivalencia molar retardó ligeramente la aparición de asistolia. Sin embargo, los corazones de este grupo fallaron en última instancia. El ARC186 añadido al plasma a
10 exceso molar de 10 veces o 50 veces conservó la frecuencia cardíaca durante la duración de cada experimento.

El porcentaje de aumento del peso del corazón sobre la línea basal se calculó para una muestra representativa de corazones con insuficiencia (sin aptámero o con exceso molar de 50 veces de aptámero irrelevante) y se comparó con corazones protegidos por ARC186 (exceso molar de 10 veces y 50 veces de ARC186). Como se muestra en la
15 Figura 27, los corazones protegidos con ARC186 aumentaron significativamente menos de peso que los corazones con insuficiencia en los grupos de control.

Debido a que ARC186 inhibe la escisión de C5 pero no de C3, deberían encontrarse productos de escisión de C3 (C3a) pero no productos de escisión de C5 (C5a o C5b) en el efluente que fluye de los corazones aislados protegidos por ARC186. Para mostrar directamente que ARC186 inhibía la escisión de C5 de plasma humano, se midieron los niveles relativos de las proteínas de complemento humano C5a y C5b (productos de escisión de C5) y C3a (un producto de escisión de C3) en el efluente de tampón de los diversos grupos por kits de ELISA disponibles en el mercado (kit de ELISA de C5b-9, Quidel, San Diego, CA; kit de ELISA de C5a y C3a, BD Biosciences, San Diego, CA). ARC186 inhibió la escisión de C5 de plasma humano y la producción de C5a (Figura 28) y C5b-9
20 (Figura 29) de una manera dependiente de dosis. Por el contrario, ARC186 no tuvo efecto en la escisión de C3 humano en C3a y C3b (Figura 30) lo que demuestra adicionalmente la especificidad de C5 de la molécula.

Una vez generados, los fragmentos del complemento C3b y C5b se depositan localmente en tejidos en las cercanías del sitio de activación del complemento. Después de la compleción de los experimentos, se congelaron corazones de ratón en medio OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA), se seccionaron y después se tiñeron usando inmunohistoquímica convencional con respecto a la presencia de C3b humano (clon H11, Chemicon, Temecula, CA), C5b-9 humano (clon aE11, DAKO, Carpintería, CA) o IgG de ratón de control (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Los resultados del estudio se presentan en la Figura 31.
30

Como se describe en este estudio, el aptámero que bloquea C5 ARC186 se ensayó en un modelo *ex vivo* de daño tisular mediado por el componente del complemento C5 que usa corazones de ratón aislados perfundidos con tampón Krebs Heinseleit y plasma humano heparinizado 6 %, basándose en un modelo descrito en un estudio previamente publicado que ensayaba los efectos del anticuerpo anti C5, Pexelizumab en el sistema del complemento (Evans, Molecular Immunol 32: 1183, (1995). Usando este modelo, se demostró que el aptámero que
40 bloquea C5 (a) inhibía la escisión de C5 de plasma humano (pero no C3), (b) inhibía la deposición de C5b humano (pero no C3b) en tejido cardíaco de ratón y (c) inhibía la disfunción miocárdica mediada por C5b-9 humano a concentraciones clínicamente relevantes (5 μ M, un exceso molar 10 veces del aptámero frente a C5). Estos datos muestran que cuando se activa la cascada del complemento humano de una manera fisiológicamente relevante, los aptámeros que bloquean C5 son capaces de inhibir la escisión de C5 de plasma y evitar el daño y disfunción
45 miocárdicos.

Ejemplo 4B: eficacia del aptámero PEGilado

El material y los métodos usados en este estudio fueron exactamente los mismos que se han descrito en el Ejemplo 4A anterior. El diseño experimental y los resultados se presentan en la Figura 32. La primera mitad del experimento usó plasma heparinizado humano (Center for Blood Research, Harvard Medical School, Boston, MA) como una fuente del complemento y la segunda mitad usó plasma de macaco *cynomolgus* heparinizado (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) como una fuente del complemento. Se añadió un aptámero PEGilado (ARC658; SEC ID N^o: 62) al sistema a relaciones molares crecientes. Aunque se recogieron todos los seguimientos de presión ventricular relevantes, la tabla enumera la presencia o ausencia de un aumento de la presión diastólica final (EDP), si se produjo o no asistolia y el tiempo hasta la insuficiencia cardíaca (definida como la presencia de una EDP elevada y asistolia).
50

Durante experimentos con plasma humano, se determinó que la dosis óptima de AR658 (SEC ID N^o: 62) era la equivalencia molar (500 nM) mientras que durante experimentos con plasma de primate no humano, fue necesario un exceso molar de 50 veces (25 μ M) para proteger el corazón de daño mediado por C5b (véase Figura 32).
60

Estos datos son coherentes con la diferencia en la afinidad del aptámero anti C5 por C5 humano frente a primate no humano indicada por los datos *in vitro*. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, durante los estudios de los inventores de PK/PD de macaco *cynomolgus* posteriores en el Ejemplo 5, se demostró adicionalmente que era necesario un exceso molar de 30 veces de aptámero para inhibir la escisión de C5 de plasma mediada por
65

zimosano, lo que apoya adicionalmente la noción de que el aptámero se une a C5 de primate con menor afinidad que C5 humano.

5 Colectivamente, estos estudios indican que los aptámeros que bloquean C5 tanto ARC 186 (SEC ID N°: 4) como en mayor grado ARC658 (SEC ID N°: 62) son eficaces en el modelo de corazón perfundido, aislado de ratón. Este modelo también demostró que había que usar significativamente más ARC658 (SEC ID N°: 62) para inhibir el daño cardíaco mediado por C5 de plasma de macaco cynomolgus (exceso molar 30+), en comparación con daño cardíaco mediado por C5 humano (equivalencia molar), apoyando adicionalmente los datos *in vitro* que indicaron que el aptámero tenía menor afinidad por C5 de primate. Finalmente, estos datos indicaron que se necesitaría dosificar a los macacos cynomolgus un exceso molar mayor de 30 veces para demostrar bloqueo de C5 *in vivo* durante estudios de PK/PB.

EJEMPLO 5

15 Metabolismo y farmacocinética farmacológicos de aptámeros anti C5 en animales

En los Ejemplos 5A-5G, todos los datos de concentración basados en la masa se refieren solamente al peso molecular de la parte oligonucleotídica del aptámero, independientemente de la masa conferida por conjugación con PEG.

20

Ejemplo 5A: estabilidad metabólica del inhibidor de C5 ARC186 en plasma de primate y rata

El precursor oligonucleotídico no PEGilado de los aptámeros (es decir, ARC 186; SEC ID N°: 4) se ensayó en plasma de rata y macaco cynomolgus (Charles River Labs, Wilmington, MA) para evaluar su estabilidad, cinética de velocidad, y rutas de degradación. Se realizaron ensayos usando aptámero radiomarcado en el extremo 5' (³²P) incubado a 37 °C en plasma agrupado al 95 % (citratado) durante el transcurso de 50 horas. En puntos temporales seleccionados, se retiraron alícuotas de plasma que contenía aptámeros, se congelaron inmediatamente de forma instantánea en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80 °C. La detección y análisis del aptámero y sus metabolitos en plasma se consiguió usando extracción de líquido-líquido (fenol-cloroforno) seguido de electroforesis en gel (en un gel de secuenciación de poliacrilamida desnaturalizante al 10 %) y autorradiografía de alta resolución.

30

La Figura 33 muestra una representación lineal logarítmica del porcentaje restante del aptámero de longitud completa en función del tiempo de incubación en plasma tanto de rata como de macaco cynomolgus. El perfil de degradación en ambas especies parece ser esencialmente monofásico, con una velocidad constante de aproximadamente $k = 0,002 \text{ h}^{-1}$.

35

Ejemplo 5B: farmacocinética de ARC657, ARC658 y ARC187 en la rata después de administración intravenosa

Para evaluar el perfil farmacocinético de ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC 187 (SEC ID N°: 5), y para estimar el nivel de dosificación y frecuencia requeridos en primates y seres humanos, se realizó un estudio farmacocinético en ratas Sprague-Dawley cateterizadas (Charles River Labs, Wilmington, MA). Se formularon aptámeros para inyección a 10 mg/ml (peso del oligo) en solución salina convencional y se esterilizaron por filtración (0,2 µm) en un frasco de dosificación preesterilizado en condiciones asépticas. La vía de administración usada para el estudio de ratas fue una embolada intravenosa a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. Las ramas del estudio consistieron en tres animales por grupo, de los que se tomaron muestras sanguíneas en serie antes de la dosis y en puntos temporales específicos durante el transcurso de 48 horas. El diseño del estudio se perfila en la Figura 34. Se obtuvieron muestras sanguíneas de los catéteres de la vena yugular implantados quirúrgicamente, se transfirieron directamente a tubos recubiertos con EDTA, se mezclaron por inmersión, y se colocaron en hielo hasta su procesamiento para plasma.

50

El plasma se recogió por centrifugación de tubos de EDTA-sangre a 5000 rpm durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante (plasma) a un tubo premarcado nuevo. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta el momento del análisis. El análisis de muestras de plasma con respecto a ARC187 se consiguió usando un formato de ensayo homogéneo utilizando la adición directa de alícuotas de plasma para ensayar pocillos que contenían el reactivo de detección de ácidos nucleicos fluorescente disponible en el mercado Oligreen™ (Molecular Probes, Eugene, OR). Después de un periodo de incubación breve (5 minutos) a temperatura ambiente, protegidas de la luz, las placas de ensayo se leyeron por un lector de placas de fluorescencia (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La señal de fluorescencia de cada pocillo fue proporcional a la concentración de aptámero en el pocillo, y las concentraciones en plasma se calcularon por interpolación de valores de fluorescencia de una curva patrón de concentración-fluorescencia (valores medios de curvas duplicadas o triplicadas). Se obtuvieron las concentraciones en plasma medias en cada punto temporal a partir de los tres animales en cada grupo. Se sometieron los datos de concentración en plasma frente a tiempo a análisis no compartimental (NCA) usando el software de modelación farmacocinética convencional de la industria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Se obtuvieron estimaciones para los siguientes parámetros farmacocinéticos primarios: concentración en plasma máxima, $C_{\text{máx}}$; área bajo la curva de concentración-tiempo, AUC; semivida terminal, $t_{1/2}$; eliminación terminal, C_1 ; y volumen de distribución en estado estacionario, V_{ss} .

65

Se muestran los datos de concentración en plasma media frente a tiempo en la Figura 35 y se representan en la Figura 36. Los datos de concentración frente al tiempo se sometieron a análisis no compartimental (NCA) usando WinNonLin™ v.4.0. Este análisis produjo los valores presentados en la Figura 37.

5 Como se anticipaba, el aptámero de 40 kDa ARC187 (SEC ID N°: 5) tuvo la semivida más larga y el aptámero de 20 kDa, ARC657 (SEC ID N°: 61), la más corta. El V_{ss} observado en relación con el volumen de plasma conocido (~40 ml/kg) sugirió un grado moderado de unión/secuestro de ARC 187 (SEC ID N°: 5) con proteínas y/o matriz tisular en el espacio extravascular. Asumiendo la necesidad de mantener un exceso molar de 5 veces del aptámero, los resultados de este estudio sugirieron que ARC 187 (SEC ID N°: 5) proporciona una ventaja significativa con respecto a la frecuencia de dosificación y la cantidad total de aptámero necesaria para mantener los niveles en plasma deseados.

Estudios previos (datos no mostrados) en roedores y primates con aptámeros de composición similar han mostrado proporcionalidad/linealidad de la dosis a dosis de hasta 30 mg/kg, de modo que no se anticipa que este nivel de dosificación dé como resultado un comportamiento farmacocinético no lineal.

Ejemplo 5C: farmacocinética de ARC187 y ARC1905 en el ratón después de administración intravenosa

20 Para evaluar el perfil farmacocinético de la cadena principal oligonucleotídica de ARC186 (SEC ID N°: 4) conjugada con un PEG ramificado de 40 kDa diferente al de ARC 187 (SEC ID N°:5), se realizó un estudio farmacocinético en ratones hembra CD-1 (obtenidos de Charles River Labs, Wilmington, MA). Se formularon aptámeros para inyección a 2,5 mg/ml (peso del oligo) en solución salina convencional y se esterilizaron por filtrado (0,2 μ m) en un frasco de dosificación preesterilizado en condiciones asépticas. La vía de administración usada para el estudio de ratón fue una embolada intravenosa a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. Las ramas del estudio consistieron en 3 animales por grupo, de los que se tomaron muestras sanguíneas terminales antes de la dosis (es decir, el grupo de control no dosificado) y en puntos temporales especificados durante el transcurso de 72 horas. El diseño del estudio se resume en la Figura 38A.

30 Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca terminal, se transfirieron directamente a tubos recubiertos con EDTA, se mezclaron por inversión, y se colocaron en hielo hasta su procesamiento para plasma. Se recogió plasma por centrifugación de tubos de sangre-EDTA a 5000 rpm durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante (plasma) a un tubo premarcado nuevo. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta el momento del análisis. Se realizó análisis de las muestras de plasma con respecto a ARC187 y 1905 usando un formato de ensayo homogéneo utilizando la adición directa de alícuotas de plasma a pocillos de ensayo que contenían el reactivo de detección de ácidos nucleicos fluorescente disponible en el mercado Oligreen™ (Molecular Probes, Eugene, OR). Después de un breve periodo de incubación (5 minutos) a temperatura ambiente, protegidas de la luz, las placas de ensayo se leyeron por un lector de placas de fluorescencia (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La señal de fluorescencia de cada pocillo fue proporcional a la concentración de aptámero en el pocillo, y se calcularon las concentraciones de la muestra por interpolación de valores de fluorescencia de una curva patrón de fluorescencia-concentración (valores medios de curvas duplicadas o triplicadas). Se obtuvieron concentraciones en plasma medias en cada punto temporal de los tres animales en cada grupo. Los datos de concentración en plasma frente a tiempo se sometieron a análisis no compartimental (NCA) usando el software de modelación farmacocinética convencional de la industria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Se obtuvieron estimaciones para los siguientes parámetros farmacocinéticos primarios: concentración en plasma máxima, $C_{m\acute{a}x}$; área bajo la curva de concentración-tiempo, AUC; semivida terminal, $t_{1/2}$; eliminación terminal, C_1 ; y volumen de distribución en estado estacionario, V_{ss} . Los datos de concentración en plasma medios frente al tiempo se representan en la Figura 38B.

50 Los datos de concentración frente al tiempo se sometieron a análisis no compartimental (NCA) usando WinNonLin™ v.4.0. Este análisis produjo los valores presentados en la Figura 38C. Como se anticipaba, los PEG de 40 kDa de ambos proveedores mostraron equivalencia farmacocinética en ratones.

Se analizaron las mismas muestras de plasma con respecto a ARC 187 y 1905 usadas para el análisis de oligreen descrito directamente antes usando un ensayo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) validado con detección de UV.

60 Los valores de concentración en plasma medios para ARC 187 y ARC1905 se calcularon usando Microsoft Excel 2003. Cuando los valores de concentración en plasma estuvieron por debajo del LLOQ del ensayo bioanalítico en predosis (tiempo 0), se asignó un valor cero. Los valores por debajo del LLOQ de muestras tomadas después de la dosis se omitieron de los cálculos de concentración en plasma medios. Los datos de concentración en plasma medios se usaron en un análisis de PK independiente de modelo usando WinNonlin, versión 5.1 (Pharsight Corporation, Mountainview, CA). El área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo ($AUC_{0-\acute{u}ltimo}$) se estimó usando la regla trapezoidal lineal. Para los cálculos, cualquier valor que estuviera por debajo del LLOQ del ensayo, excepto la muestra predosis, se excluyó de los cálculos con respecto a estimaciones de parámetros PK. La semivida terminal aparente se calculó usando la fórmula $t_{1/2} = 0,693/\lambda_z$ en la que λ_z es la constante de velocidad de eliminación estimada a partir de la regresión de la pendiente terminal de la curva de concentración frente a tiempo.

Se usaron al menos tres valores de concentración de plasma después de la concentración máxima en la fase terminal para determinar λ_z y se requirió que el coeficiente de determinación (r^2) fuera $\geq 0,85$.

En general, el análisis de HPLC confirma el análisis de oligreen descrito inmediatamente antes que muestra que se descubrió que ARC 1905 y ARC187 eran bioequivalentes basándose en comparaciones de estimaciones de parámetros medios de $C_{m\acute{a}x}$, $AUC_{0-\acute{u}ltimo}$ y $AUC_{0-\infty}$. Las diferencias de los valores de $AUC_{0-\acute{u}ltimo}$ y $AUC_{0-\infty}$ para ARC1905 en relación con ARC 187 (como se mide por HPLC) estaban dentro de los criterios de aceptabilidad de bioequivalencia de $\pm 20 \%$.

10 Ejemplo 5D: estudio de captación tisular de los inhibidores de C5 ARC657, ARC658 y ARC187 en el ratón después de administración por embolada intravenosa

Se obtuvieron ratones hembra CD-1 de Charles River Labs (Wilmington, MA). La formulación de ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC187 (SEC ID N°: 5) para inyección fue en solución salina a 5 mg/ml. Las formulaciones de dosificación se esterilizaron por filtración (0,2 μm) en frascos de dosificación preesterilizados en condiciones asépticas y se proporcionó a los animales una embolada intravenosa a través de la vena de la cola a una dosis de 25 mg/kg. El estudio consistió en grupos de 3 animales para cada uno de cuatro puntos temporales, t =predosis, 3, 6, 12 horas. Después del sangrado, la vasculatura de cada animal se lavó abundantemente de forma exhaustiva ($V \sim 30$ ml) con solución salina para retirar cualquier sangre que quedara en la vasculatura. Se recogieron tejidos (corazón, hígado, riñón), se pesaron, después se homogeneizaron a 50 % p/v en solución salina convencional, y se almacenaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento del análisis.

Se realizó análisis de tejido con respecto a ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC187 (SEC ID N°: 5) usando un ensayo de tipo ELISA basado en la hibridación. En este ensayo, se preinmovilizó una sonda de captura biotinilada en los pocillos de una microplaca de 96 pocillos a una concentración de solución de unión de 125 nM durante 3 horas. Los pocillos de la placa se lavaron 5 veces con PBS 1X. Las placas se bloquearon después con 150 μl /pocillo de SuperBlock 1X en TBS (Pierce Chemical, Rockford, IL). Las placas se lavaron de nuevo, se cubrieron y se almacenaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. En tubos separados, la muestra o las muestras se hibridaron en un tampón que contenía una sonda de detección de muestra marcada con FAM (fluoresceína 5') a 200 nM a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos, y después se inactivaron en hielo. Los patrones de concentración y muestras de control de plasma/tejido también se prehibridaron con soluciones de sonda de detección de muestra y después se pipetearon en pocillos de placas de ensayo que contenían sonda de captura de biotina inmovilizada, y se hibridaron a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2,5 horas. Después las placas se lavaron de nuevo, y se cargaron con 100 μl /pocillo de una solución que contenía PBS 1X que contenía 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo monoclonal anti fluoresceína conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (MAb-HRP anti FITC, Molecular Probes, Eugene, OR) en PBS 1X, y se incubaron durante aproximadamente 1 hora. Las placas se lavaron de nuevo como anteriormente. Los pocillos de las placas de ensayo se cargaron después con 100 μl de una solución que contenía un sustrato de HRP fluorogénico (QuantaBlu, Pierce Chemical, Rockford, IL) y se incubaron durante 20-30 minutos protegidos de la luz. Después de 45 minutos de incubación, se añadió una solución de parada 100 μl /pocillo para interrumpir la reacción de producción de precipitado fluorescente. Las placas se leyeron inmediatamente en un lector de microplacas de fluorescencia (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) con excitación de fluorescencia a 325 nm y emisión detectada a 420 nm. Cada pocillo se leyó 10 veces. Los tres aptámeros eran detectables en el tejido cardíaco en los tres puntos temporales (Figura 39).

45 Ejemplo 5E: farmacocinética y farmacodinámica de los inhibidores de C5 ARC657, ARC658 y ARC187 en el macaco cynomolgus después de administración intravenosa-estudio 1

La formulación de ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC187 (SEC ID N°: 5) para inyección fue en una solución salina convencional a 10 mg/ml y las formulaciones de dosificación se esterilizaron por filtración (0,2 μm) en frascos de dosificación preesterilizados en condiciones asépticas. La vía de administración usada para el estudio de macacos fue una embolada intravenosa mediante un catéter en la vena femoral implantado quirúrgicamente a una dosis de 30 mg/kg (un exceso molar de aproximadamente 50 veces). El diseño del estudio se perfila en la Figura 40. Se obtuvieron muestras sanguíneas de los catéteres de la vena femoral, se transfirieron directamente a tubos recubiertos con citrato sódico, se mezclaron por inversión, y se colocaron en hielo hasta que se centrifugaron para separar el plasma (3000 rpm durante 5 minutos). El plasma se dividió después en alícuotas de 250 μl que se almacenaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ y se evaluó una alícuota de cada muestra con respecto a concentración de aptámero usando el ensayo basado en fluorescencia Oligreen™ descrito anteriormente en la sección de PK de rata anterior.

Los datos de concentración en plasma primario frente al tiempo se presentan en forma tabular en la Figura 41. Como se anticipaba, el aptámero ARC 187 con PEG de 40 kDa (SEC ID N°: 5) persistió en plasma durante el periodo de tiempo más largo mientras que el aptámero ARC657 con PEG de 20 kDa (SEC ID N°: 61) persistió durante el periodo de tiempo más corto. La inspección de los datos mostrados en la Figura 41 sugirió que los datos se ajustarían mejor por un modelo de dos compartimentos. Por lo tanto, las estimaciones de parámetros farmacocinéticos indicadas en la Figura 42 se derivaron del modelo de dos compartimentos usando el software de

modelación farmacocinética convencional de la industria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

Como se muestra en la Figura 42, todos los aptámeros tuvieron un valor de $C_{m\acute{a}x}$ similar, entre 23 y 30 μM , lo que indicaba que la dosis del aptámero (30 mg/kg) fue suficiente para conseguir un exceso molar de 50 veces de concentración en plasma de aptámero frente a C5 (exceso molar de 50 veces, aproximadamente 25 μM). Aunque difieren en 10.000 de peso molecular, ARC657 (PEG de 20 kDa) (SEC ID N°: 61) y ARC658 (PEG de 30 kDa) (SEC ID N°: 62) tuvieron valores similares de exposición (AUC), $t_{1/2}(\alpha)$ y $t_{1/2}(\beta)$. Por el contrario, ARC 187 (SEC ID N°: 5) tuvo valores de exposición significativamente mayores (AUC), un $t_{1/2}(\alpha)$ prolongado y un $t_{1/2}(\beta)$ ligeramente más largo que las otras moléculas.

Se analizaron posteriormente alícuotas adicionales de las muestras de plasma recogidas durante el estudio de farmacocinética *in vitro* para determinar la eficacia del bloqueo de C5 de primates. El ensayo de activación de zimosano se procesó como se ha descrito anteriormente para determinar la cantidad de C5b-9 y C5a de primate generados, respectivamente. Los datos se representaron en varios formatos diferentes incluyendo concentración de C5b-9 frente a tiempo de muestra (Figura 43a), concentración de C5b-9 frente a concentración de aptámero (Figura 43b), concentración de C5a frente a tiempo de muestra (Figura 43c) y concentración de C5a frente a concentración de aptámero (Figura 43d).

El aptámero ARC 187 con PEG de 40 kDa (SEC ID N°: 5) inhibió la escisión de C5 de primate (concentración de C5b-9 y C5a) durante el periodo de tiempo más largo (Figuras 43a y 43c). Cuando los datos de C5b-9 y C5a se representaron frente a la concentración de aptámero, esto indicó que la concentración de aptámero de bloqueo de C5 debía exceder un exceso molar de 30 veces, independientemente del tamaño de las moléculas de PEG, para que la escisión de C5 se inhibiera completamente (Figuras 43b y 43d).

En resumen, los datos del estudio de PK/PD de macaco cynomolgus demuestran que (a) como se anticipaba, fue necesario al menos un exceso molar de 30 veces de aptámero (concentración de aptámero en plasma de aproximadamente 15 μM) para inhibir la escisión de C5 *in vivo* en el macaco cynomolgus, independientemente del tamaño del grupo de PEG, (b) los aptámeros que bloquean C5 no provocaron toxicidad manifiesta en esta especie, y (c) cuando se dosificó a los animales a niveles relativamente altos (exceso molar de 50 veces), los niveles de aptámero en plasma estaban dentro del intervalo de ensayo apropiado durante el periodo de toma de muestras para permitir el cálculo de los parámetros farmacocinéticos.

Ejemplo 5F: farmacocinética y farmacodinámica de los inhibidores de C5 ARC658 y ARC187 en el macaco cynomolgus después de administración intravenosa-estudio 2

El estudio 2 fue similar en su diseño al estudio 1 descrito anteriormente, con las siguientes excepciones a) se evaluaron solamente dos compuestos (ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC187 (SEC ID N°: 5); b) el número de animales se aumentó a cuatro por grupo, y c) la muestra en plasma de 1 minuto se suprimió y se reemplazó con una muestra de 144 horas para asegurar que el cálculo de la semivida terminal se basara en más puntos de datos. La formulación y dosificación de estos dos aptámeros, toma de muestras de sangre y técnicas de aislamiento de plasma fueron idénticas a los métodos descritos anteriormente en el estudio 1. El diseño para el estudio 2 se resume en la Figura 44.

Después de la compleción del estudio 2, se analizaron alícuotas de plasma como se ha descrito en el estudio 1 para determinar a) la concentración de aptámero en plasma en diversos puntos temporales después de la administración intravenosa, y b) la eficacia del bloqueo de C5.

La concentración de aptámero en plasma se representó en función del tiempo (Figura 45) y se presentan los datos primarios para ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC187 (SEC ID N°: 5) en forma tabular en las Figuras 39 y 40, respectivamente. El aptámero ARC187 con PEG de 40 kDa (SEC ID N°: 5) persistió en plasma durante el periodo de tiempo más largo. La inspección de la Figura 45 indicó que los datos se ajustarían mejor por un modelo de dos compartimentos. Por lo tanto, las estimaciones de parámetros farmacocinéticos presentadas en la Figura 46 derivaron del modelo de dos compartimentos usando WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

Comparando los parámetros farmacocinéticos generados durante el estudio 1 y estudio 2 de PK/PD anteriores, los datos para ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC187 (SEC ID N°: 5) fueron similares con la excepción de la medición de $t_{1/2}(\alpha)$ para ARC187. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la discrepancia en las mediciones de $t_{1/2}(\alpha)$ para ARC 187 entre los dos estudios probablemente se deba al pequeño tamaño de muestra en el estudio piloto.

Como se demuestra en la Figura 46, los valores de $C_{m\acute{a}x}$ fueron similares para ARC658 (SEC ID N°: 62) y ARC187 (SEC ID N°: 5). Por el contrario, la exposición a fármaco (AUC) fue significativamente mayor en animales tratados con ARC187 (SEC ID N°: 5). Además, ARC187 tuvo valores de $t_{1/2}(\alpha)$ y $t_{1/2}(\beta)$ prolongados en comparación con ARC658 (SEC ID N°: 62). Estos datos, junto con los datos generados durante el estudio 1 de PK/PD indican que los aptámeros que bloquean C5 ARC187 pueden proporcionar el bloqueo de C5 *in vivo* más eficaz para una dosis dada.

Se realizaron posteriormente alícuotas adicionales de las muestras de plasma recogidas durante el estudio de farmacocinética para determinar la eficacia del bloqueo de C5 de primate. Como antes, el ensayo de activación de zimosano se procesó para determinar la cantidad de C5b-9 y C5a de primate, respectivamente, generada. Los datos se representaron como concentración de C5b-9 frente a concentración de aptámero (Figura 47) y concentración de C5a frente a concentración de aptámero (Figura 48). Como se ha demostrado previamente durante el estudio 1 de PK/PD, la concentración de aptámero que bloquea C5 debe exceder un exceso molar de 30 veces (concentración de aptámero y C5 en plasma), o aproximadamente 15 μM , independientemente del tamaño de la molécula de PEG, para que la escisión de C5 de primate se inhiba completamente (Figuras 41 y 42).

Inspeccionando los datos en las tablas de las Figuras 39 y 40, resulta evidente que después de una embolada I.V. de 30 mg/kg, ARC658 (SEC ID N^o: 62) permanece por encima de 15 μM durante aproximadamente 4 horas mientras que ARC187 permanece por encima de 15 μM durante aproximadamente 8 horas. Por lo tanto, dada una dosis de fármaco similar, el aptámero ARC 187 de 40 K proporciona eficacia clínica durante aproximadamente el doble de tiempo que el aptámero ARC658 de 30 K (SEC ID N^o: 62).

En resumen, los macacos cynomolgus deben tratarse con al menos un exceso molar de 30 veces de aptámero frente a C5 en plasma para bloquear la conversión de C5 *in vivo*. Estos datos son coherentes con los estudios previos *in vitro* (hemólisis) y *ex vivo* (corazón de ratón perfundido aislado) que sugieren que los aptámeros que se unen con C5 tenían una menor afinidad por C5 de primate frente a C5 humano. Se ha mostrado que los aptámeros que bloquean C5 pueden suministrarse de forma segura como una embolada intravenosa a una dosis de hasta 30 mg/kg, que equivale a aproximadamente un exceso molar de 50 veces de concentración de aptámero frente a C5.

Ejemplo 5G: ARC1905 en el macaco cynomolgus después de administración de embolada IV

La farmacodinámica de los inhibidores de C5 ARC1905 se evaluó en el macaco cynomolgus después de administración intravenosa. La formulación de ARC 1905 para inyección fue en solución salina convencional a 7,5 mg/ml y las formulaciones de dosificación se esterilizaron por filtración (0,2 μm) en frascos de dosificación preesterilizados en condiciones asépticas. Se dosificó a los monos cynomolgus (n=4) a 0 (control de solución salina) o 30 mg/kg mediante administración por embolada intravenosa. Se obtuvieron muestras de sangre de una vena periférica o el orificio de acceso arterial y se transfirieron las muestras de sangre (0,5 ml) a tubos de EDTA dipotásico (K₂), se colocaron en hielo húmedo, y se centrifugaron en un periodo de 30 minutos desde la recogida a aproximadamente 4 °C.

Las muestras de plasma se analizaron *in vitro* para determinar la eficacia de ARC1905 en el bloqueo de C5 de primate. El ensayo de zimosano previamente descrito con respecto a ARC 1905 en el Ejemplo 1C se usó para determinar la cantidad de C5a de primate generada. La reducción de los valores de C5a post-zimosano a las 0,5 y 2 horas después de la dosificación indica que ARC1905 inhibe la escisión de C5 *in vivo* en el macaco cynomolgus de una manera similar a ARC 187 cuando se dosifica a aproximadamente la misma concentración y por la misma vía de administración como se mide *in vitro* usando el ensayo de activación de zimosano.

Ejemplo 5H: farmacocinética y farmacodinámica del inhibidor de C5 ARC187 en el macaco cynomolgus después de la administración por embolada IV e infusión

También se evaluaron los perfiles farmacocinético (PK) y farmacodinámico (PD) de ARC 187 (SEC ID N^o: 5) en macacos cynomolgus después de una embolada de carga intravenosa seguido inmediatamente del inicio de una infusión intravenosa. Este diseño de estudio se muestra en la Figura 49.

La dosis de embolada de carga y velocidad de infusión necesarias para conseguir la concentración en plasma de estado estacionario diana de 1 μM se calcularon usando los parámetros farmacocinéticos derivados del estudio solamente de embolada IV enumerado en la Figura 50.

Se administró a un total de tres macacos cynomolgus una embolada IV de ARC187 a 1 mg/kg, seguido inmediatamente por el inicio de una infusión IV a una velocidad de 0,0013 mg/kg/minuto durante un periodo de 48 horas. Se recogieron muestras de sangre completa de 0 a 192 horas después del tratamiento, se almacenaron en hielo húmedo, se procesaron para plasma, y después se almacenaron congeladas a -80 °C. La concentración de ARC187 en muestras de plasma se determinó usando tanto un ensayo de tinción de ácido nucleico fluorescente (descrito en el Ejemplo 5B) como un ensayo de cromatografía líquida de rendimiento validado por GLP (HPLC). El método de ensayo de HPLC para la determinación de ARC187 en plasma de mono se validó por ClinTrials Bio-Research (Montreal, Canadá). El estudio de validación cumplió las regulaciones de la Buena Práctica de Laboratorio (GLP) de la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) (21 CFR §58). El método de ensayo de HPLC se validó con respecto a: selectividad, linealidad, límite inferior de cuantificación (LLOQ), transferencia, precisión y exactitud intraensayo, precisión y exactitud interensayo, estabilidad de solución de reserva, estabilidad del medio de inyección, estabilidad de la matriz a corto plazo, estabilidad de congelación-descongelación, estabilidad de la matriz a largo plazo e integridad en dilución. Se determinó que el intervalo de concentración dinámica lineal utilizable del ensayo era de 0,080 a 50,0 μM .

El perfil de PK medido de ARC187 en estas condiciones se adaptó bien al perfil calculado generado usando solamente los parámetros de PK y embolada IV (véase Figura 51). La concentración en plasma diana de 1 μM se estableció en < 5 minutos después de la dosis y se mantuvo durante la duración completa de la infusión. Después de cesar la infusión, el aptámero mostró una semivida de eliminación terminal, $t_{1/2}$ (β) de ~ 40-60 horas.

La actividad farmacodinámica de ARC187 (SEC ID N°: 5) en el macaco cynomolgus se evaluó *ex vivo* usando muestras de plasma recogidas durante el estudio de PK en el ensayo de activación de zimosano previamente descrito con la modificación de que el plasma de muestra de cynomolgus se diluyó 10 veces en plasma humano 10 % y después se trató con zimosano 5 mg/ml. La activación de C5, como se refleja por la aparición del producto de escisión de C5a, se midió por ELISA específico de C5a humano (kit de ELISA de C5a, BD Biosciences, San Diego, CA). La concentración de ARC187 activo en cada muestra se cuantificó después por comparación con una curva patrón derivada de ensayos de zimosano usando muestras preparadas con niveles de ARC187 conocidos (véase Figura 52). Este estudio indica que ARC187 mantiene su actividad anticomplemento durante todo el transcurso de y después de la infusión, a niveles sustancialmente coherentes con el perfil farmacocinético descrito anteriormente.

Ejemplo 5I: predicción de los requisitos de dosificación humana

Los requisitos de dosificación humana para prevención, alivio o tratamiento de complicaciones relacionadas con cirugía de CABG se basan en las siguientes suposiciones: en primer lugar, se administrará a pacientes de CABG una única dosis de embolada intravenosa del aptámero anti C5 antes de iniciar la cirugía, seguido de infusión continua para establecer y mantener una concentración en plasma de estado estacionario de 1,5 μM durante 24-48 horas después de la cirugía de CABG. Las estimaciones de dosis de embolada y velocidad de infusión se basan en cálculos usando los parámetros farmacocinéticos derivados de los estudios previamente descritos solamente en embolada IV y embolada más infusión en macacos cynomolgus. La dosis de embolada estimada de ARC 187 es de 1 mg/kg, y la velocidad de infusión asociada es de 0,0013 mg/kg/minuto. Para este régimen de embolada más infusión de 48 horas, el requisito farmacológico total anticipado es de 0,4 g para ARC187, donde la masa se refiere solamente al peso oligonucleotídico (véase columna 7 en la tabla de la Figura 53). La columna 2 de la tabla mostrada en la Figura 53 se refiere al peso del grupo de PEG conjugado con la parte oligonucleotídica de ARC 187, la columna tres se refiere al peso molecular de la parte oligonucleotídica de ARC187 (y será igual para todos los aptámeros en el presente documento que comprenden ARC186 (SEC ID N°: 4) como su secuencia oligonucleotídica), la columna 4 se refiere al peso molecular de PEG de 40 kDa conjugado con ARC186 (SEC ID N°: 4) mediante química reactiva de amina como se ha descrito en el Ejemplo 3C anterior, la columna 5 se refiere a la semivida de fase α de ARC187 en un modelo de dos compartimentos, y la columna seis se refiere a semivida de fase β de ARC187 en un modelo de dos compartimentos.

EJEMPLO 6

Aptámeros anti C5 e interacción de heparina/protamina

Una aplicación anticipada del aptámero anti C5 es como un producto profiláctico para la prevención o mitigación de los efectos secundarios inflamatorios asociados con la cirugía de injerto de derivación de arteria coronaria (CABG). Se administran normalmente altas concentraciones del anticoagulante heparina (3 - 5 unidades/ml o 1 - 2 μM) durante CABG para evitar la trombosis y mantener la permeabilidad dentro de componentes de la bomba de derivación; la inversión del efecto de la heparina después del procedimiento, y restauración de la hemostasis normal, se consigue por la administración de concentraciones similarmente altas de protamina (~ 5 μM). Dados los peligros potenciales para pacientes de cualquier interferencia en la eficacia de uno de estos fármacos, fue necesario demostrar que los aptámeros anti C5 (1) no alteran las actividades de uno de los fármacos y (2) no presentan efectos inherentes en la hemostasis que pudieran complicar el tratamiento anticoagulación del paciente.

La heparina es un polisacárido sulfatado con una carga negativa neta y una masa molecular media de aproximadamente 15 kDa que ejerce un efecto inhibitor en varias proteasas en la cascada de coagulación promoviendo interacciones con antritrombina. La protamina, un polipéptido cargado de forma altamente positiva, es capaz de bloquear la actividad de heparina mediante una interacción poco caracterizada que es de naturaleza al menos parcialmente electrostática. El núcleo funcional de ARC187 (SEC ID N°: 5), como la heparina, es altamente aniónico. Por lo tanto, es concebible que ARC187 podría unirse de forma no específica con sitios de unión a heparina o protamina e interferir con las actividades de estas moléculas. Los siguientes estudios investigaron las propiedades anticoagulantes inherentes (es decir, de tipo heparina) de ARC187. Los efectos de ARC187 en la función de la heparina, los efectos de ARC187 en la neutralización de heparina por protamina, y los efectos de protamina en las propiedades inhibitoras de complemento de ARC187.

Ejemplo 6A: efectos *in vitro* de ARC187 en la coagulación

Los efectos inherentes de ARC 187 (SEC ID N°: 5) en la capacidad de coagulación del plasma se investigaron usando ensayos clínicos convencionales de las ramas extrínseca e intrínseca de la cascada de coagulación, el tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), respectivamente. Como se

muestra en la Figura 54, la valoración del plasma humano citratado con concentraciones muy superiores a las dosis proyectadas (hasta 20 μM) no dio como resultado ningún cambio en el PT, y solamente una ligera elevación en el aPTT.

5 Para evaluar los efectos *in vitro* de ARC187 en las funciones de heparina y protamina, se extrajo sangre de 3 individuos en 4-5 unidades/ml de heparina, dosis asociadas con niveles de heparina usados en la cirugía de CABG. La capacidad de coagulación de estas muestras se evaluó usando el tiempo de coagulación activado (ACT), un ensayo de coagulación de sangre completa usado habitualmente para controlar la actividad de la heparina durante la
10 cirugía. A estas concentraciones de heparina, en ausencia de otros aditivos, el ACT se prolongó significativamente a partir de un valor de línea basal de ~ 150 segundos a ~ 500 segundos en presencia de 4 U/ml de heparina o ~ 800 segundos en presencia de 5 U/ml de heparina. La adición de ARC 187 10 μM a estas muestras tuvo poco efecto en el tiempo de coágulo, lo que demuestra que ARC 187 no interfiere con la actividad anticoagulante de la heparina.

15 El efecto anticoagulante de la heparina se neutralizó fácilmente mediante valoración con protamina hasta 6-8 μM (4 U/ml de heparina) o 12 μM (5 U/ml de heparina). Los valores de ACT en presencia de heparina y concentraciones neutralizadoras de protamina fueron esencialmente indistinguibles de la línea basal. Puesto que el núcleo de ácido nucleico de ARC187 (12 kDa) es de mayor peso molecular que la protamina (5 kDa), se podría esperar que concentraciones equimolares de ARC187 añadidas a protamina fueran suficientes para invertir completamente la actividad neutralizadora de la protamina. Sin embargo, la preincubación de protamina con concentraciones
20 aproximadamente equivalentes de ARC187 tuvo poco efecto en el ACT. Las muestras de sangre que contenían concentraciones neutralizadoras de protamina presentaron valores de ACT similares en presencia o ausencia de ARC187 10 μM , lo que indica que ARC187 tiene un efecto solamente pequeño, si lo tiene, en la actividad procoaguladora de protamina. Estos resultados se resumen en la Figura 55.

25 Ejemplo 6B: efectos *in vivo* de ARC187 en la coagulación

Las interacciones entre la función de la heparina y la protamina durante la administración simultánea del aptámero anti C5 ARC187 (SEC ID N^o: 5), a dosis clínicas de heparina y dosis clínicas/subclínicas/superclínicas de protamina se investigaron para determinar si la presencia de concentraciones en plasma subclínicas/superclínicas de ARC187
30 interferirían con la inversión de la anticoagulación de heparina por protamina. Los resultados del estudio se resumen en la Figura 56. Brevemente, los valores de ACT de línea basal no se vieron afectados por ARC187 10 μM (es decir, exceso molar de 10 veces de la dosis clínica) a todas las dosis de heparina ensayadas. De forma similar, el alcance de la anticoagulación por heparina no se vio afectado por ARC187 10 μM . En ausencia de ARC187, la dosis eficaz mínima de protamina fue de ~ 30 % (dosis clínicas=100 %). Además, la inversión de la anticoagulación de heparina por protamina 30 % no se vio afectada por exceso molar de 10 veces de la dosis clínica (es decir, 10 μM) de
35 ARC187. Por lo tanto, el uso de ARC187 para inhibición del complemento en una situación clínica (por ejemplo, CABG) no debería verse afectado por el uso simultáneo de heparina y protamina a dosis típicas.

40 Ejemplo 6C: efecto de la heparina y protamina en la función anticomplemento de ARC187

Los efectos de la heparina y protamina en la actividad anticomplemento de ARC187 (SEC ID N^o: 5) se examinaron en muestras de sangre completa citratada activadas con zimosano, como se ha descrito en el Ejemplo 1. Justo antes de la activación de zimosano, se valoró ARC187 en muestras de sangre citratada tratada en cuatro
45 condiciones: 1) sin tratamiento (sin heparina ni protamina); 2) heparina 4 U/ml; 3) protamina 6 μM ; 4) heparina 4 U/ml + protamina 6 μM . Después de la activación con zimosano, la activación de C5 se cuantificó por medición de ELISA de sC5b-9 en plasma (kit de ELISA de C5b-9, Quidel, San Diego, CA). Para cada condición, los resultados, expresados como porcentaje de inhibición de la activación de C5 frente a concentración de ARC 187, fueron indistinguibles dentro del error (véase Figura 57). En todos los casos se consiguió inhibición completa con ARC 187
50 1-2 μM . Por lo tanto, la heparina y protamina por separado o combinadas a concentraciones relevantes para su uso en la cirugía de CABG, no parecen afectar a la actividad anticomplemento de ARC187.

Habiéndose descrito ahora la invención mediante descripción escrita y ejemplos, los expertos en la materia reconocerán que la invención puede practicarse en diversas realizaciones y que la descripción y ejemplos anteriores son para fines de ilustración y no limitación de las siguientes reivindicaciones.

55 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Archemix Corp., *et al.*
- 60 <120> Productos terapéuticos de aptámero útiles en el tratamiento de trastornos relacionados con el complemento
- <130> 23239-576 CIP-061
- 65 <150> 11/058.134

<151> 14-02-2005

<160> 102

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 38
 <212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> aptámero sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <223> la citosina en las posiciones 3, 4, 6 y 37 es 2'-fluoro

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> la uridina en las posiciones 9, 30 y 31 es 2'-fluoro

<220>
 <221> misc_feature

25 <222> (1)..(1)
 <223> n en la posición 1 es 2'-fluoro citidina o 2'-O-metil citidina

<220>
 <221> misc_feature

30 <222> (2)..(2)
 <223> n en la posición 2 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina

<220>
 <221> misc_feature

35 <222> (7)..(7)
 <223> n en la posición 7 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina

<220>
 <221> misc_feature

40 <222> (8)..(8)
 <223> n en la posición 8 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina

<220>
 <221> misc_feature

45 <222> (10)..(10)
 <223> n en la posición 10 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina

<220>
 <221> misc_feature

50 <222> (11)..(11)
 <223> n en la posición 11 es 2'-fluoro uridina o desoxi timidina

<220>
 <221> misc_feature

55 <222> (12)..(12)
 <223> n en la posición 12 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina

<220>
 <221> misc_feature

60 <222> (13)..(13)
 <223> n en la posición 13 es 2'-OH adenosina o 2'-O-metil adenosina

<220>
 <221> misc_feature

65 <222> (14)..(14)

<223> n en la posición 14 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (15)..(15)
 <223> n en la posición 15 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (16)..(16)
 <223> n en la posición 16 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (18)..(18)
 <223> n en la posición 18 es 2'-fluoro citosina o 2'-O-metil citosina
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (19)..(19)
 <223> n en la posición 19 es 2'-fluoro uridina o 2'-O-metil uridina
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (20)..(20)
 <223> n en la posición 20 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (21)..(21)
 <223> n en la posición 21 es 2'-OH adenosina o 2'-O-metil adenosina
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (22)..(22)
 <223> n en la posición 22 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (23)..(23)
 <223> n en la posición 23 es 2'-fluoro uridina o desoxi timidina
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (24)..(24)
 <223> n en la posición 24 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (25)..(25)
 <223> n en la posición 25 es 2'-fluoro uridina o desoxi timidina
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (26)..(26)
 <223> n en la posición 26 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (27)..(27)
 <223> n en la posición 27 es 2'-OH adenosina o 2'-O-metil adenosina
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (28)..(28)
 <223> n en la posición 28 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina

ES 2 449 047 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n en la posición 29 es 2'-fluoro uridina o desoxi timidina
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> n en la posición 32 es 2'-OH adenosina o 2'-O-metil adenosina
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> n en la posición 33 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> n en la posición 34 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> n en la posición 35 es 2'-fluoro uridina o desoxi timidina
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> n en la posición 36 es 2'-OH guanósina o 2'-O-metil guanósina
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> n en la posición 38 es 2'-OH guanósina o 2'-O-metil guanósina
 35

<400> 1
 nnccgcnun nnnnnngnnn nnnnnnnnnu unnnnncn 38

<210> 2
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40

<220>
 <223> aptámero sintético
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi, y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanósina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 55

<400> 2
 cgccgcguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38
 60

<210> 3
 <211> 42
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 65

ES 2 449 047 T3

<220>
 <223> aptámero sintético

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

10

<400> 3
 gacgaugcgg ucucaugcgu cgagugugag uuuaccuucg uc 42

15

<210> 4
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20

<220>
 <223> aptámero sintético

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

40

<400> 4
 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

45

<210> 5
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

50

<220>
 <223> aptámero sintético

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> la citosina en la posición 1 está modificada por un PEG ramificado de 40 kDa (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida)) unido con el nucleótido mediante un adaptador de amina

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)

ES 2 449 047 T3

<223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

5 <400> 5
cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 6
<211> 44
<212> ARN
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> aptámero sintético

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(44)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

20 <400> 6
aggacgauc ggucucaugc gucgagugug aguuuaccuu cguc 44

<210> 7
<211> 40
<212> ARN
<213> secuencia artificial

25 <220>
<223> aptámero sintético

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 2, 7 y 19, en las que la guanosina es 2'-OH, y las posiciones 1 y 34, en las que la adenosina es 2'-OH

40 <400> 7
agcggcgg ucucaggcg ucagucugag uuuaccugcg 40

45 <210> 8
<211> 40
<212> ARN
<213> secuencia artificial

50 <220>
<223> aptámero sintético

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

60 <400> 8
ggcggcgg ucucaggcg ucagucugag uuuaccugcg 40

<210> 9
<211> 39
<212> ADN
<213> secuencia artificial

65 <220>
<223> aptámero sintético

ES 2 449 047 T3

<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
5 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16, 24, 33 y 34, en las que la citidina es desoxi, y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (39)..(39)
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

<400> 9
20 cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcgt 39

<210> 10
<211> 39
<212> ADN
25 <213> secuencia artificial

<220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (1)..(38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo, excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro, excepto en las posiciones 10, 12, 16, 24, 33 y 34, en las que la citidina es desoxi; en las posiciones 1, 3, y 37, en las que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina

<220>
<221> misc_feature
40 <222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro, excepto en las posiciones 10, 12, 16, 24, 33 y 34, en las que la citidina es desoxi; en las posiciones 1, 3, y 37, en las que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (39)..(39)
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

<400> 10
50 cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcgt 39

<210> 11
<211> 38
<212> ADN
55 <213> secuencia artificial

<220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature
60 <222> (1)..(38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo, excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

<220>
65

ES 2 449 047 T3

5
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 1, 3, 10, 12, 16, 24 y 37, en las que la citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

<400> 11
cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

10
<210> 12
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

15
<220>
<223> aptámero sintético

20
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

25
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 1, 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi, y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

30
<400> 12
cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

35
<210> 13
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

40
<220>
<223> aptámero sintético

45
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

50
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 3, 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y la posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina

55
<400> 13
cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

60
<210> 14
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

65
<220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)

ES 2 449 047 T3

<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16, 24 y 37, en las que la citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina

10 <400> 14
cgccgcggucc tcaggcgcu ggtctgaguu uaccugcg 38

<210> 15
<211> 38
15 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> aptámero sintético

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
30 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16, y 24, en las que la citidina es desoxi; en la posición 3, en las que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina

<400> 15
35 cgccgcggucc tcaggcgcu ggtctgaguu uaccugcg 38

<210> 16
<211> 38
40 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> aptámero sintético

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en la posición 37, en la que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

55 <400> 16
cgccgcggucc tcaggcgcu ggtctgaguu uaccugcg 38

60 <210> 17
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

65 <220>

<223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en la posición 1, en las que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 15 <400> 17
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38
 <210> 18
 20 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 25 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en las posiciones 1, 3 y 37, en las que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 40 <400> 18
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38
 <210> 19
 45 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 50 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 4, 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 <400> 19
 65 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38
 <210> 20

ES 2 449 047 T3

<211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> aptámero sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 6, 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y las posiciones 1, 23 y 25, que son desoxi timidina

15

<400> 20
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 21
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20

<220>
 <223> aptámero sintético

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 4, 6, 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

35

<400> 21
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

40

<210> 22
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45

<220>
 <223> aptámero sintético

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16, 18 y 24, en las que la citidina es desoxi; y las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

60

<400> 22

65

ES 2 449 047 T3

cgccgcggucc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

5 <210> 23
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> aptámero sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 19, 23 y 25, que son desoxi timidina

25 <400> 23
 cgccgcggucc tcaggcgctg agtctgaguu uaccugcg 38

30 <210> 24
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> aptámero sintético

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16, 18 y 24, en las que la citidina es desoxi; y las posiciones 11, 19, 23 y 25, que son desoxi timidina

50 <400> 24
 cgccgcggucc tcaggcgctg agtctgaguu uaccugcg 38

55 <210> 25
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

60 <220>
 <223> aptámero sintético

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

70 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es

ES 2 449 047 T3

desoxi; y en las posiciones 11, 23, 25 y 29, que son desoxi timidina

5 <400> 25
cgccgcgguc tcaggcgug agtctgagtu uaccugcg 38

<210> 26
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> aptámero sintético

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

20 <220>

25 <221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23, 25 y 30, que son desoxi timidina

30 <400> 26
cgccgcgguc tcaggcgug agtctgagut uaccugcg 38

35 <210> 27
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

40 <220>
<223> aptámero sintético

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23, 25 y 31, que son desoxi timidina

55 <400> 27
cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu taccugcg 38

60 <210> 28
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

65 <220>
<223> aptámero sintético

<220>
<223> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

ES 2 449 047 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23, 25, 29, 30 y 31, que son desoxi timidina

5

<400> 28
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgagtt taccugcg 38

10

<210> 29
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15

<220>
 <223> aptámero sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23, 25 y 35, que son desoxi timidina

25

<400> 29
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uacctgcg 38

30

<210> 30
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35

<220>
 <223> aptámero sintético

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16, 24, 33 y 34, en las que la citidina es desoxi; en la posición 9, en la que la uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

50

<400> 30
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

55

<210> 31
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

60

<220>
 <223> aptámero sintético

65

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 449 047 T3

<222> (1) .. (38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

5 <220>

<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en la posición 4, en la que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina

10

<400> 31
cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

15 <210> 32
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> aptámero sintético

<220>

25 <221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en la posición 6, en la que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina

35 <400> 32
cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

40 <210> 33
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45 <220>
<223> aptámero sintético

<220>

50 <221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

<220>

55 <221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en las posiciones 4 y 6, en las que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

60 <400> 33
cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 34
<211> 38
<212> ADN

65

<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> aptámero sintético
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y en la posición 18, en la que la citosina es 2'-O-metilo
 15
 <400> 34
 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcg 38
 20
 <210> 35
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y en la posición 19, en la que la uridina es 2'-O-metilo
 35
 <400> 35
 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcg 38
 40
 <210> 36
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> aptámero sintético
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en la posición 18, en la que la citosina es 2'-O-metilo; y en la posición 19, en la que la uridina es 2'-O-metilo
 60
 65

ES 2 449 047 T3

<400> 36
 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcg 38

5
 <210> 37
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10
 <220>
 <223> aptámero sintético

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en la posición 29, en la que la uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

25
 <400> 37
 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

30
 <210> 38
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35
 <220>
 <223> aptámero sintético

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en la posición 30, en la que la uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

50
 <400> 38
 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

55
 <210> 39
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

60
 <220>
 <223> aptámero sintético

65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

ES 2 449 047 T3

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en la posición 31, en la que la uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

10 <400> 39
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

15 <210> 40
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> aptámero sintético

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en las posiciones 29, 30 y 31, en las que la uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

35 <400> 40
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

40 <210> 41
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> aptámero sintético

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en la posición 35, en la que la uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

60 <400> 41
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

65 <210> 42
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

70 <220>
 <223> aptámero sintético

ES 2 449 047 T3

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en la posición 5, en la que la guanosina es desoxi; en la posición 17, en la que la guanosina es 2'-OH; y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

15 <400> 42
cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

20 <210> 43
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

25 <220>
<223> aptámero sintético

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en la posición 5, en la que la guanosina es 2'-OH; en la posición 17, en la que la guanosina es desoxi; y la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

40 <400> 43
cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

45 <210> 44
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

50 <220>
<223> aptámero sintético

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH; y la posición 32, en la que la adenosina es desoxi

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

65 <400> 44
cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 45
<211> 40
<212> ADN
<213> secuencia artificial

ES 2 449 047 T3

<220>
 <223> aptámero sintético

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (40)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 6 y 18, en las que la guanosina es 2'-OH; y la posición 33, en la que la adenosina es 2'-OH

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (40)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 11, 13, 17 y 25, en las que la citidina es desoxi; en la posición 40, en la que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 12, 24 y 26, que son desoxi timidina

15

<400> 45
 ggcugcggcu ctcaggcgcu gagtctgagu uuaccuacgc 40

20

<210> 46
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

25

<220>
 <223> aptámero sintético

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH; y la posición 32, en la que la adenosina es desoxi

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que la citidina es desoxi; en las posiciones 36, 37 y 38 en las que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

40

<400> 46
 gggcgcgguu tcaggcgcu agtctgagu uaccuccc 38

45

<210> 47
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

50

<220>
 <223> aptámero sintético

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (40)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 6 y 18, en las que la guanosina es 2'-OH; y la posición 33, en la que la adenosina es 2'-OH

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (40)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 11, 13, 17 y 25, en las que la citidina es desoxi; en la posición 40, en la que la citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 12, 24 y 26, que son desoxi timidina

65

<400> 47
 ggcggcgguu ctcaggcgcu gagtctgagu uuaccugcgc 40

ES 2 449 047 T3

<210> 48
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> aptámero sintético

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (44)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 8 y 20, en las que la guanosina es 2'-OH; y la posición 35 en la que la adenosina es 2'-OH

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (44)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45) .. (45)
 <223> timidina en la posición 45 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

25

<400> 48
 ggacgccgcg gucucaggcg cugagucuga guuuaccugc gucut 45

30

<210> 49
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35

<220>
 <223> aptámero sintético

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (42)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que la guanosina es 2'-OH; y en la posición 34, en la que la adenosina es 2'-OH

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (42)
 <223> todas las citosinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 12, 14, 18, 26, 35 y 36, que son desoxi citidina; y las posiciones 20, 41 y 42, en las que la citosina es 2'-O-metilo

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (42)
 <223> todas las uridinas son 2'-fluoro; excepto en la posición 21, en la que la uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 13, 25, 27, 31 y 37, que son desoxi timidina

55

<400> 49
 ggcgccgagg uctcaggcgc ugagtctgag tuuacctgcg cc 42

60

<210> 50
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

65

<220>
 <223> aptámero sintético

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 449 047 T3

<222> (1) .. (42)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que la guanosina es 2'-OH; y en la posición 34, en la que la adenosina es 2'-OH

5
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (42)
<223> todas las citosinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 12, 14, 18, 26, 35, 36 y 39, que son desoxi citidina; y en las posiciones 3, 20, 41 y 42, en las que la citosina es 2'-O-metilo

10
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (42)
<223> la uridina en la posición 11 es 2'-fluoro; uridina en la posición 21 es 2'-O-metilo; las posiciones 13, 25, 27, 31, 32, 33 y 37 son desoxi timidina

15
<400> 50
ggcgccgcg uctcaggcgc ugagtctgag ttacctgcg cc 42

20
<210> 51
<211> 42
<212> ADN
<213> secuencia artificial

25
<220>
<223> aptámero sintético

30
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (42)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que la guanosina es 2'-OH

35
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (42)
<223> la citosina en las posiciones 5, 6, 8, 12, 14, 18, 26, 35, 36 y 39 son desoxi citidina; y la citosina en las posiciones 3, 20, 41 y 42 son 2'-O-metilo

40
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (42)
<223> la uridina en la posición 21 es 2'-O-metilo; las posiciones 11, 13, 25, 27, 31, 32, 33 y 37 son desoxi timidina

45
<400> 51
ggcgccgcg tctcaggcgc ugagtctgag ttacctgcg cc 42

50
<210> 52
<211> 42
<212> ADN
<213> secuencia artificial

55
<220>
<223> aptámero sintético

60
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (42)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que la guanosina es 2'-OH

65
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (42)
<223> uridina en las posiciones 13, 21, 25 y 27 son 2'-O-metilo; las posiciones 11, 31, 32, 33 y 37 son

desoxi timidina

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1) .. (42)
 <223> la citosina en las posiciones 5, 6, 8, 12, 18, 35, 36 y 39 son desoxi citidina; y la citosina en las posiciones 3, 14, 20, 26, 41 y 42 son 2'-O-metilo

<400> 52
 10 ggcgccgagg tcucagggcgc ugagucugag ttacctgccc 42

<210> 53
 <211> 40
 <212> ARN
 15 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> aptámero sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> la adenosina en la posición 1 tiene biotina conjugada con el extremo 5'

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (40)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 3, 8 y 20, en las que la guanosina es 2'-OH; y en la posición 2, en la que la adenosina es 2'-OH

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (40)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

<400> 53
 35 agccgccgagg ucucagggcgc ugagucugag uuuaccugcc 40

<210> 54
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> aptámero sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (42)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que la guanosina es 2'-OH; y en la posición 34, en la que la adenosina es 2'-OH

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (42)
 <223> todas las citosinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 12, 14, 18 y 26, que son desoxi citidina; y en las posiciones 41 y 42, en las que la citosina es 2'-O-metilo

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (42)
 <223> todas las uridinas son 2'-fluoro; las posiciones 13, 25, y 27 son desoxi timidina

<400> 54
 65 ggcgccgagg uctcagggcgc ugagtctgag uuuaccugcc cc 42

ES 2 449 047 T3

<210> 55
 <211> 42
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (42)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que la guanosina es 2'-OH; y en la posición 34, en la que la adenosina es 2'-OH
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (42)
 <223> todas las citosinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 12, 14, 18, 26, 41 y 42, en las que la citosina es 2'-O-metilo
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (42)
 <223> todas las uridinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 13, 25 y 27, en las que la uridina es 2'-O-metilo
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (42)
 <223> todas las uridinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 13, 25 y 27, en las que la uridina es 2'-O-metilo
 25
 <400> 55
 ggcgccgagg ucucagggcg ucagucugag uuuaccugcg cc 42
 30
 <210> 56
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39) .. (39)
 <223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')
 50
 <400> 56
 cgccgagguc ucagggcguc agucugaguu uaccugcgt 39
 55
 <210> 57
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 65

ES 2 449 047 T3

<222> (1) .. (38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en la posición 18, en la que la citosina es 2'-O-metilo; y en la posición 19 en la que la uridina es 2'-O-metilo

5
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)

10
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH; y en la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
<222> (39) .. (39)

15
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

<400> 57
cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

20
<210> 58
<211> 39
<212> ADN
<213> secuencia artificial

25
<220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)

30
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en la posición 29, que es desoxi timidina

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)

35
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH; y en la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
<222> (39) .. (39)

40
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

<400> 58
cgccgcgguc ucaggcgug agucugagtu uaccugcgt 39

45
<210> 59
<211> 39
<212> ADN

50
<213> secuencia artificial

<220>
<223> aptámero sintético

55
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)

60
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH

65
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)

<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en la posición 18, en las que la citosina es 2'-O-metilo; y la posición 19, en la que la uridina es 2'-O-metilo

ES 2 449 047 T3

5
<220>
<221> misc_feature
<222> (39) .. (39)
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

<400> 59
cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

10
<210> 60
<211> 39
<212> ADN
<213> secuencia artificial

15
<220>
<223> aptámero sintético

20
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH

25
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en la posición 18, en la que la citosina es 2'-O-metilo; en la posición 19, en la que la uridina es 2'-O-metilo; y en la posición 29, que es desoxi timidina

30
<220>
<221> misc_feature
<222> (39) .. (39)
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

35
<400> 60
cgccgcgguc ucaggcgug agucugagtu uaccugcgt 39

40
<210> 61
<211> 39
<212> ADN
<213> secuencia artificial

45
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> la citosina en la posición 1 está modificada por un PEG de 20 kDa unido con el nucleótido mediante un adaptador de amina

50
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

55
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (38)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

60
<220>
<221> misc_feature
<222> (39) .. (39)
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

65

ES 2 449 047 T3

<400> 61
 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

5 <210> 62
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> aptámero sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> la citosina en la posición 1 está modificada por un PEG de 30 kDa unido con el nucleótido mediante un adaptador de amina

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

35 <400> 62
 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

40 <210> 63
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> aptámero sintético

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> la citosina en la posición 1 está modificada por un adaptador de amina 5'

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

65

ES 2 449 047 T3

<400> 63
 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

5 <210> 64
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> aptámero sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> la citosina en la posición 1 está modificada por un PEG de 10 kDa unido con el nucleótido mediante un adaptador de amina

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

35 <400> 64
 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

40 <210> 65
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> aptámero sintético

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> la citosina en la posición 1 está modificada por un PEG lineal de 40 kDa unido con el nucleótido mediante un adaptador de amina

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

ES 2 449 047 T3

<400> 65
 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

5 <210> 66
 <211> 38
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> aptámero sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> la citosina en la posición 1 está modificada por un PEG de 20 kDa unido con el nucleótido mediante un adaptador de amina

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> la guanosina en la posición 38 está modificada por un PEG de 20 kDa unido con el nucleótido mediante un adaptador de amina

35 <400> 66
 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcg 38

40 <210> 67
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> aptámero sintético

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> la citosina en la posición 1 está modificada por un PEG ramificado de 40 kDa (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamóilo) unido con el nucleótido mediante un adaptador de amina

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que la guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que la adenosina es 2'-OH

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> la timidina en la posición 39 es una desoxitimidina invertida 3' (unida 3'-3')

ES 2 449 047 T3

<400> 67
 cgccgagguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

5 <210> 68
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> aptámero sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(46)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

<400> 68
 ggcgauuacu gggacggacu cgcgauguga gccagacga cucgcc 46

20 <210> 69
 <211> 40
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> aptámero sintético

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

35 <400> 69
 ggcucugaa gauuauuucg cgaugugaac uccagacccc 40

40 <210> 70
 <211> 92
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(69)
 <223> n puede ser cualquier nucleótido (a, c, g o t)

50 <400> 70

taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctacn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnng gtcgatcgat cgatcatcga tg 92

55 <210> 71
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 71
 taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctac 39

ES 2 449 047 T3

5
 <210> 72
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10
 <220>
 <223> cebador sintético

15
 <400> 72
 catcgatgat cgatcgatcg acc 23 36

20
 <210> 73
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial

25
 <220>
 <223> región fija sintética

30
 <400> 73
 gggagaggag agaacguucu ac 22

35
 <210> 74
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial

40
 <220>
 <223> región fija sintética

45
 <400> 74
 ggucgaucga ucgaucg aug 23

50
 <210> 75
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

55
 <220>
 <223> aptámero sintético

60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(75)
 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

65
 <400> 75

70
gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggggucgauc 60

75
gaucgaucgau cgaug 75

80
 <210> 76
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

85
 <220>
 <223> aptámero sintético

90
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(32)
 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

ES 2 449 047 T3

<400> 76
ccuugguuug gcacaggcau acauacgcag gg 32

5 <210> 77
<211> 32
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
15 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

<400> 77
ccuugguuug gcacaggcau acaaacgcag gg 32

20 <210> 78
<211> 25
<212> ADN
<213> secuencia artificial

25 <220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(25)
30 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

<400> 78
ggguuuggca caggcauaca uaccc 25

35 <210> 79
<211> 25
<212> ADN
<213> secuencia artificial

40 <220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(25)
45 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

<400> 79
ggguuuggca caggcauaca aaccc 25

50 <210> 80
<211> 32
<212> ADN
55 <213> secuencia artificial

<220>
<223> aptámero sintético

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

65 <400> 80
ggcggcacag gcauacauac gcaggggucg cc 32

ES 2 449 047 T3

<210> 81
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(47)
 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo
 10
 <400> 81
 cguucuaccu ugguuuggca caggcauaca uacgcagggg ucgaucg 47
 15
 <210> 82
 <211> 88
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> molde sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(69)
 <223> n puede ser cualquier nucleótido (a, t, c o g)
 25
 <400> 82
 30
taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctacn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnng ttacgactag catcgatg 88
 <210> 83
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> molde sintético
 40
 <400> 83
 cttggttg cacagcata catacgcagg ggtcgatcg 39
 45
 <210> 84
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 84
 taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctac 39
 55
 <210> 85
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> cebador sintético

ES 2 449 047 T3

<400> 85
 catcgatgct agtcgtaac 19

5
 <210> 86
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial

10
 <220>
 <223> región fija sintética

<400> 86
 gggagaggag agaacguucu ac 22

15
 <210> 87
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial

20
 <220>
 <223> región fija sintética

<400> 87
 guuacgacua gcaucgaug 19

25
 <210> 88
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30
 <220>
 <223> aptámero sintético

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(80)
 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

40
 <400> 88

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggca.caggca uacauacgca ggggucgauc 60
gguuacgacu agcaucgaug 80

45
 <210> 89
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

50
 <220>
 <223> aptámero sintético

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(80)
 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

60
 <400> 89

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggca.caggca uacauacgca ggugucgauc 60
uguuacgacu agcaucgaug 80

<210> 90
 <211> 80

ES 2 449 047 T3

	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220> <223> aptámero sintético	
10	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(80) <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo	
	<400> 90	
	gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uaaauacgca gggcucgauc	60
15	gguuacgacu agcaucgaug	80
20	<210> 91 <211> 80 <212> ADN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> aptámero sintético	
30	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(80) <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo	
	<400> 91	
	gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcccaggca uauauacgca gggauugauc	60
	cguuacgacu agcaucgaug	80
35	<210> 92 <211> 78 <212> ADN <213> secuencia artificial	
40	<220> <223> aptámero sintético	
45	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(78) <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo	
	<400> 92	
	gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcgcaggca uacauacgca ggucgaucgg	60
	uuacgacuag caucgaug	78
50	<210> 93 <211> 80 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <223> aptámero sintético	
	<220>	

ES 2 449 047 T3

<221> misc_feature
 <222> (1)..(80)
 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

5 <400> 93

gggagaggag agaacguucu accuuguugu ggcacagcca acccuacgca cggaucgccc 60

gguuacgacu agcaucgaug 80

<210> 94
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10

<220>
 <223> aptámero sintético

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(69)
 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

20 <400> 94

gggagaggag agaacguucu accuuguuu ggcacagcca uacauacgca ggucgaucgg 60

uuacgacua 69

25

<210> 95
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30

<220>
 <223> aptámero sintético

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(79)
 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

40 <400> 95

gggagaggag agaacguucu accuuagguu cgcacuguca uacauacaca cgggcaaucg 60

guuacgacua gcaucgaug 79

<210> 96
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45

<220>
 <223> aptámero sintético

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(75)
 <223> en la que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> n puede ser cualquier nucleótido (a, t, u, c o g)

catcgatgct agtcgtaacg atccnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnncgagaa 60
cgttctctcc tctcctata gtgagtcgta tta 93

5 <210> 100
 <211> 92
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> molde sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(53)
 <223> n puede ser cualquier nucleótido (a, t, c o g)

<400> 100

catgcatcgc gactgactag ccgnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngtagaac 60
gttctctctc ctcctatag tgagtcgtat ta 92

20 <210> 101
 <211> 92
 <212> ADN
 <213> artificial

25 <220>
 <223> molde sintético

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(53)
 <223> n puede ser cualquier nucleótido (a, t, c o g)

<400> 101

catcgatcga tcgatcgaca gcgnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngtagaac 60
gttctctctc ctcctatag tgagtcgtat ta 92

40 <210> 102
 <211> 1676
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> C5 sintético

<400> 102

ES 2 449 047 T3

Met Gly Leu Leu Gly Ile Leu Cys Phe Leu Ile Phe Leu Gly Lys Thr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg
 20 25 30

Val Gly Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu
 35 40 45

Ala Phe Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe
 50 55 60

Ser Tyr Ser Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln
 65 70 75 80

Asn Ser Ala Ile Leu Thr Ile Gln Pro Lys Gln Leu Pro Gly Gly Gln
 85 90 95

Asn Pro Val Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser
 100 105 110

Lys Ser Lys Arg Met Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile
 115 120 125

His Thr Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg
 130 135 140

Val Tyr Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val
 145 150 155 160

Leu Thr Phe Ile Asp Pro Glu Gly Ser Glu Val Asp Met Val Glu Glu
 165 170 175

Ile Asp His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser
 180 185 190

Asn Pro Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Lys Ala Lys Tyr Lys Glu Asp
 195 200 205

Phe Ser Thr Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu
 210 215 220

Pro His Phe Ser Val Ser Ile Glu Pro Glu Tyr Asn Phe Ile Gly Tyr
 225 230 235 240

Lys Asn Phe Lys Asn Phe Glu Ile Thr Ile Lys Ala Arg Tyr Phe Tyr
 245 250 255
 Asn Lys Val Val Thr Glu Ala Asp Val Tyr Ile Thr Phe Gly Ile Arg
 260 265 270
 Glu Asp Leu Lys Asp Asp Gln Lys Glu Met Met Gln Thr Ala Met Gln
 275 280 285
 Asn Thr Met Leu Ile Asn Gly Ile Ala Gln Val Thr Phe Asp Ser Glu
 290 295 300
 Thr Ala Val Lys Glu Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Asn Asn
 305 310 315 320
 Lys Tyr Leu Tyr Ile Ala Val Thr Val Ile Glu Ser Thr Gly Gly Phe
 325 330 335
 Ser Glu Glu Ala Glu Ile Pro Gly Ile Lys Tyr Val Leu Ser Pro Tyr
 340 345 350
 Lys Leu Asn Leu Val Ala Thr Pro Leu Phe Leu Lys Pro Gly Ile Pro
 355 360 365
 Tyr Pro Ile Lys Val Gln Val Lys Asp Ser Leu Asp Gln Leu Val Gly
 370 375 380
 Gly Val Pro Val Thr Leu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Val Asn Gln Glu
 385 390 395 400
 Thr Ser Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly
 405 410 415
 Val Ala Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu
 420 425 430
 Phe Asn Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala
 435 440 445
 Arg Glu Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr
 450 455 460
 Leu Tyr Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu
 465 470 475 480
 His Leu Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile

				485						490					495
Thr	His	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	Gly	Lys	Ile	Ile	His	Phe
			500					505					510		
Gly	Thr	Arg	Glu	Lys	Phe	Ser	Asp	Ala	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ile	Asn	Ile
		515					520					525			
Pro	Val	Thr	Gln	Asn	Met	Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Leu	Leu	Val	Tyr	Tyr
	530					535					540				
Ile	Val	Thr	Gly	Glu	Gln	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ser	Asp	Ser	Val	Trp
545					550					555					560
Leu	Asn	Ile	Glu	Glu	Lys	Cys	Gly	Asn	Gln	Leu	Gln	Val	His	Leu	Ser
			565						570					575	
Pro	Asp	Ala	Asp	Ala	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gln	Thr	Val	Ser	Leu	Asn	Met
			580					585					590		
Ala	Thr	Gly	Met	Asp	Ser	Trp	Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Val	Asp	Ser	Ala
		595					600					605			
Val	Tyr	Gly	Val	Gln	Arg	Gly	Ala	Lys	Lys	Pro	Leu	Glu	Arg	Val	Phe
	610					615					620				
Gln	Phe	Leu	Glu	Lys	Ser	Asp	Leu	Gly	Cys	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu
625					630					635					640
Asn	Asn	Ala	Asn	Val	Phe	His	Leu	Ala	Gly	Leu	Thr	Phe	Leu	Thr	Asn
				645					650					655	
Ala	Asn	Ala	Asp	Asp	Ser	Gln	Glu	Asn	Asp	Glu	Pro	Cys	Lys	Glu	Ile
			660					665					670		
Leu	Arg	Pro	Arg	Arg	Thr	Leu	Gln	Lys	Lys	Ile	Glu	Glu	Ile	Ala	Ala
		675					680					685			
Lys	Tyr	Lys	His	Ser	Val	Val	Lys	Lys	Cys	Cys	Tyr	Asp	Gly	Ala	Cys
	690					695					700				
Val	Asn	Asn	Asp	Glu	Thr	Cys	Glu	Gln	Arg	Ala	Ala	Arg	Ile	Ser	Leu
705					710					715					720
Gly	Pro	Arg	Cys	Ile	Lys	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Val	Val	Ala	Ser
				725					730					735	

Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu
740 745 750

His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr
755 760 765

Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys
770 775 780

Gln Leu Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile Gln
785 790 795 800

Gly Val Gly Ile Ser Asn Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val Lys
805 810 815

Ala Lys Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser
820 825 830

Val Val Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr
835 840 845

Arg Thr Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly
850 855 860

Ile Cys Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser
865 870 875 880

Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu Val
885 890 895

Thr Phe Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe
900 905 910

Ser Leu Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg
915 920 925

Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu
930 935 940

Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro
945 950 955 960

Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile
965 970 975

Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu
 980 985 990

Ser Gln Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser A
 995 1000 1005

Glu Ala Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His
 1010 1015 1020

Tyr Leu Glu Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro
 1025 1030 1035

Leu Ile Glu Lys Gln Lys Leu Lys Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met
 1040 1045 1050

Leu Ser Ile Met Ser Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val
 1055 1060 1065

Trp Lys Gly Gly Ser Ala Ser Thr Trp Leu Thr Ala Phe Ala Leu
 1070 1075 1080

Arg Val Leu Gly Gln Val Asn Lys Tyr Val Glu Gln Asn Gln Asn
 1085 1090 1095

Ser Ile Cys Asn Ser Leu Leu Trp Leu Val Glu Asn Tyr Gln Leu
 1100 1105 1110

Asp Asn Gly Ser Phe Lys Glu Asn Ser Gln Tyr Gln Pro Ile Lys
 1115 1120 1125

Leu Gln Gly Thr Leu Pro Val Glu Ala Arg Glu Asn Ser Leu Tyr
 1130 1135 1140

Leu Thr Ala Phe Thr Val Ile Gly Ile Arg Lys Ala Phe Asp Ile
 1145 1150 1155

Cys Pro Leu Val Lys Ile Asp Thr Ala Leu Ile Lys Ala Asp Asn
 1160 1165 1170

Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln Ser Thr Phe Thr Leu
 1175 1180 1185

Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp Lys Thr His Pro
 1190 1195 1200

ES 2 449 047 T3

Gln Phe Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu Ala Leu Val
 1205 1210 1215

Lys Gly Asn Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Asn Leu Gln
 1220 1225 1230

His Lys Asp Ser Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met Val
 1235 1240 1245

Glu Thr Thr Ala Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp
 1250 1255 1260

Ile Asn Tyr Val Asn Pro Val Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln
 1265 1270 1275

Arg Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala
 1280 1285 1290

Ile Glu Gly Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg
 1295 1300 1305

Leu Ser Met Asp Ile Asp Val Ser Tyr Lys His Lys Gly Ala Leu
 1310 1315 1320

His Asn Tyr Lys Met Thr Asp Lys Asn Phe Leu Gly Arg Pro Val
 1325 1330 1335

Glu Val Leu Leu Asn Asp Asp Leu Ile Val Ser Thr Gly Phe Gly
 1340 1345 1350

Ser Gly Leu Ala Thr Val His Val Thr Thr Val Val His Lys Thr
 1355 1360 1365

Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys Ser Phe Tyr Leu Lys Ile Asp Thr
 1370 1375 1380

Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr Arg Gly Tyr Gly Asn Ser Asp
 1385 1390 1395

Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser Tyr Lys Pro Ser Arg Glu
 1400 1405 1410

Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val Met Asp Ile Ser Leu
 1415 1420 1425

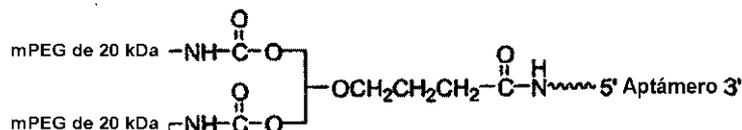
Pro Thr Gly Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu Val

1430						1435									1440
Glu Gly Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile Lys Asp Gly															
1445						1450									1455
His Val Ile Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp Phe Leu															
1460						1465									1470
Cys Val Arg Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe Leu															
1475						1480									1485
Ser Pro Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys															
1490						1495									1500
Gln Cys Thr Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys															
1505						1510									1515
Val Cys Glu Gly Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly															
1520						1525									1530
Gln Met Gln Glu Glu Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg															
1535						1540									1545
Lys Gln Thr Ala Cys Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val															
1550						1555									1560
Ser Ile Thr Ser Ile Thr Val Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys															
1565						1570									1575
Ala Thr Leu Leu Asp Ile Tyr Lys Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu															
1580						1585									1590
Lys Asp Ser Glu Ile Thr Phe Ile Lys Lys Val Thr Cys Thr Asn															
1595						1600									1605
Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg Gln Tyr Leu Ile Met Gly Lys Glu															
1610						1615									1620
Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Ser Phe Arg Tyr Ile Tyr Pro															
1625						1630									1635
Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp Pro Arg Asp Thr Thr															
1640						1645									1650
Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu Asp Glu Phe Ala															
1655						1660									1665
Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys															
1670															1675

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de aptámero/polietilenglicol (PEG) o una sal del mismo, en donde el conjugado de aptámero/PEG tiene la estructura expuesta a continuación:

5



donde ~~~~~ indica un adaptador,
donde Aptámero =

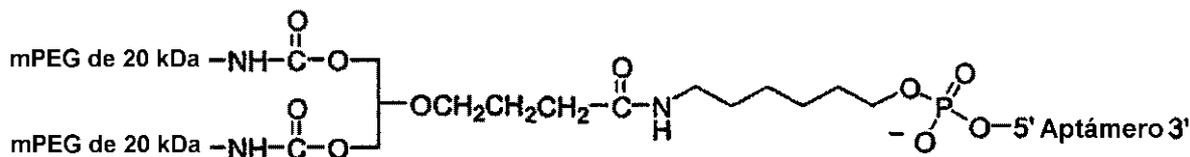
10



en la que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro y mG y mA = nucleótidos 2'-OMe y todos los otros nucleótidos son 2'-OH y 3T indica una desoxitimidina invertida.

15

2. El conjugado de aptámero/PEG de la reivindicación 1, en donde el conjugado de aptámero/PEG tiene la estructura expuesta a continuación:



20

donde Aptámero =



en la que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, y mG y mA = nucleótidos 2'-OMe y todos los otros nucleótidos son 2'-OH y 3T indica una desoxitimidina invertida.

25

3. El conjugado de aptámero/PEG de la reivindicación 1, en el que el adaptador es un adaptador de alquilo que comprende 6 grupos CH₂ consecutivos, un adaptador de alquilo que comprende entre 2 y 18 grupos CH₂ consecutivos, un adaptador de alquilo que comprende entre 2 y 12 grupos CH₂ consecutivos o un adaptador de alquilo que comprende entre 3 y 6 grupos CH₂ consecutivos.

30

4. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de aptámero/PEG de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.

35

5. El conjugado de aptámero/PEG de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en un método para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 en un mamífero.

40

6. Uso del conjugado de aptámero/PEG de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad mediada por la proteína del complemento de C5, C5a y/o C5b-9 en un mamífero.

45

7. El conjugado de aptámero/PEG de la reivindicación 5 o uso de la reivindicación 6, en el que el mamífero es un ser humano.

50

8. El conjugado de aptámero/PEG de la reivindicación 5 o uso de la reivindicación 6, en el que el trastorno es infarto de miocardio, ictus, lesión de reperfusión/isquemia, enfermedad infecciosa, septicemia, choque, alergia, asma, artritis reumatoide y otras enfermedades reumatológicas, esclerosis múltiple y otras enfermedades neurológicas, psoriasis y otras enfermedades dermatológicas, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis y otras enfermedades renales, lesión miocárdica relacionada con cirugía de derivación de arteria

- 5 coronaria (CABG), lesión miocárdica relacionada con angioplastia de globo, lesión miocárdica relacionada con reestenosis, complicaciones mediadas por proteína del complemento relacionadas con cirugía de CABG, complicaciones mediadas por proteína del complemento relacionadas con intervención coronaria percutánea, hemoglobinuria nocturna paroxística, rechazo de trasplante agudo, rechazo de trasplante hiperagudo, rechazo de trasplante subagudo o rechazo de trasplante crónico.
- 10 9. El conjugado de aptámero/PEG de la reivindicación 5 o uso de la reivindicación 6, en el que el trastorno para tratar es una enfermedad isquémica aguda, enfermedad inflamatoria aguda, enfermedad inflamatoria crónica o enfermedad mediada por el sistema inmunitario.
- 15 10. El conjugado de aptámero/PEG de la reivindicación 5 o uso de la reivindicación 6, en el que el conjugado de aptámero/PEG se administra antes de la cirugía y continuando la administración al menos 24 horas.
- 20 11. El conjugado de aptámero/PEG de la reivindicación 5 o uso de la reivindicación 6, en el que el conjugado de aptámero/PEG se administra por vía intravenosa.
- 25 12. Un método de diagnóstico *in vitro* que comprende poner en contacto el conjugado de aptámero/PEG de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con una composición que se sospecha que comprende la proteína del complemento C5 o una variante de la misma y detectar la presencia o ausencia de la proteína del complemento C5 o una variante de la misma.
- 30 13. El método de diagnóstico *in vitro* de la reivindicación 12, en el que la proteína del complemento C5 o variante de la misma es una proteína del complemento C5 o variante de la misma.
14. Uso del conjugado de aptámero/PEG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como un diagnóstico *in vitro*.
15. Un conjugado de aptámero/PEG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso como un diagnóstico *in vivo*.
16. Un conjugado de aptámero/PEG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en el tratamiento, la prevención o el alivio de enfermedad *in vivo*.

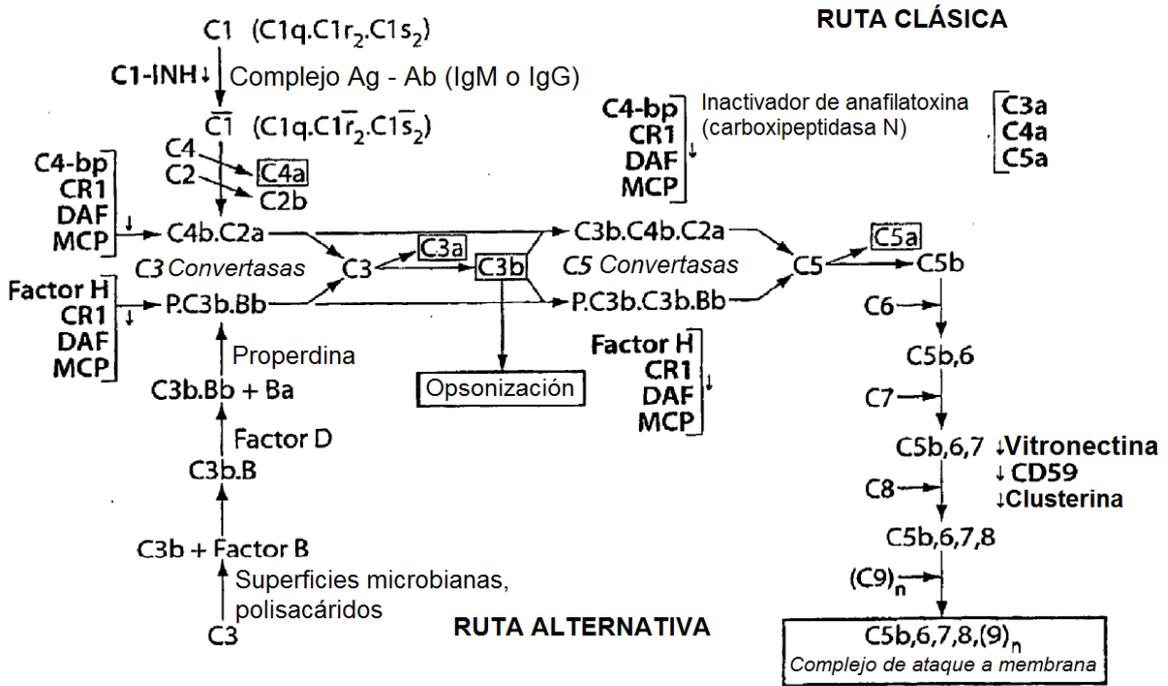


Fig. 1

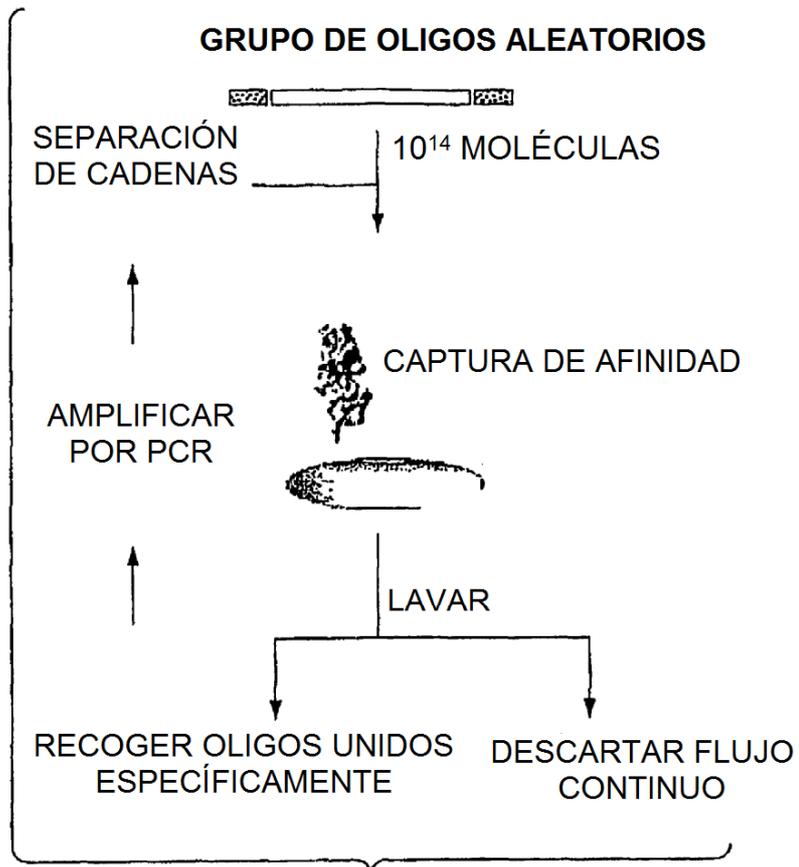


Fig. 2

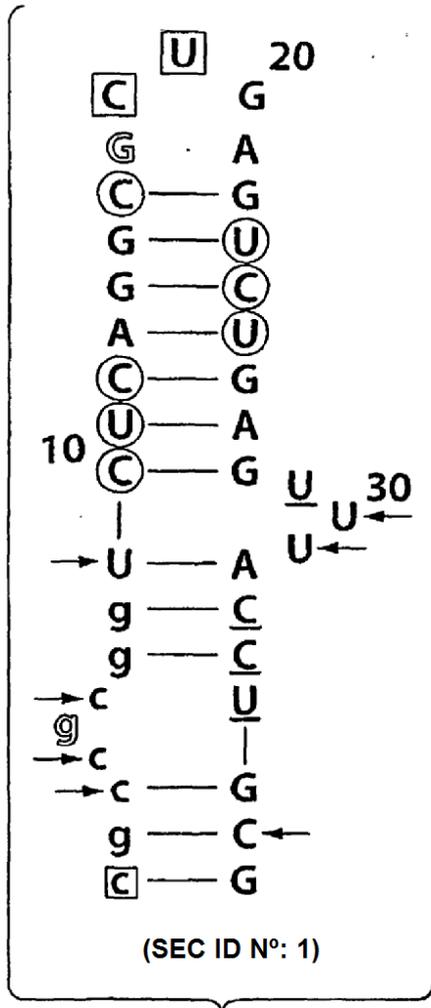


Fig. 3A

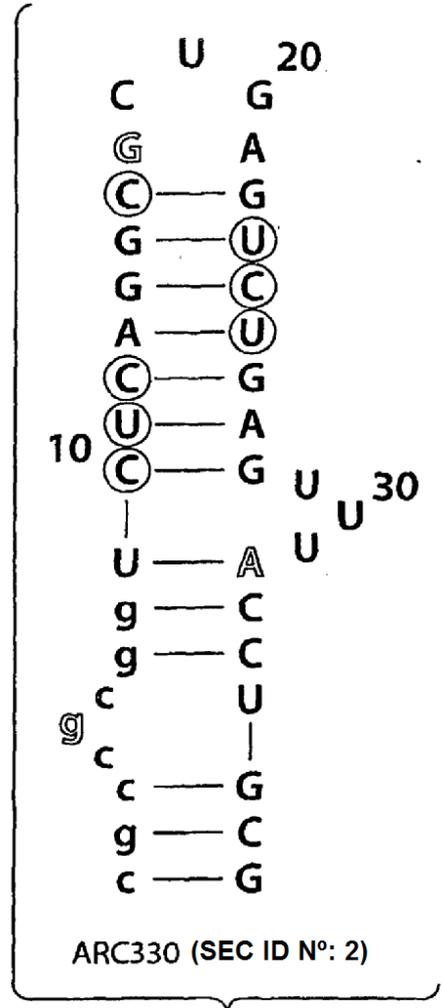


Fig. 3B

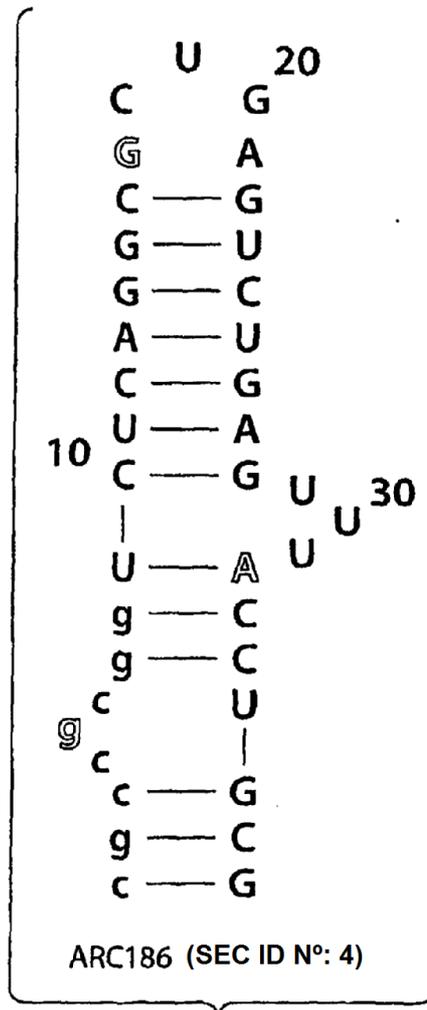


Fig. 3C

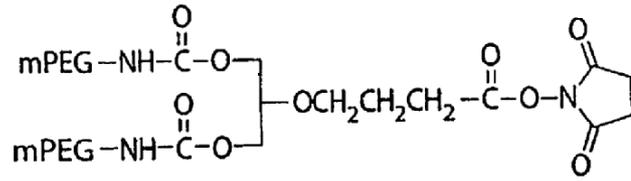


Fig. 4

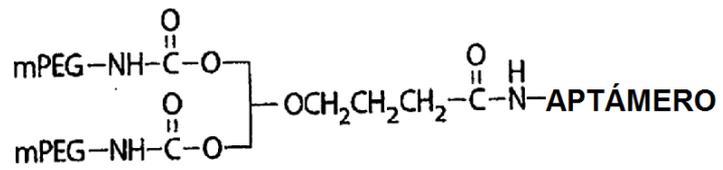


Fig. 5

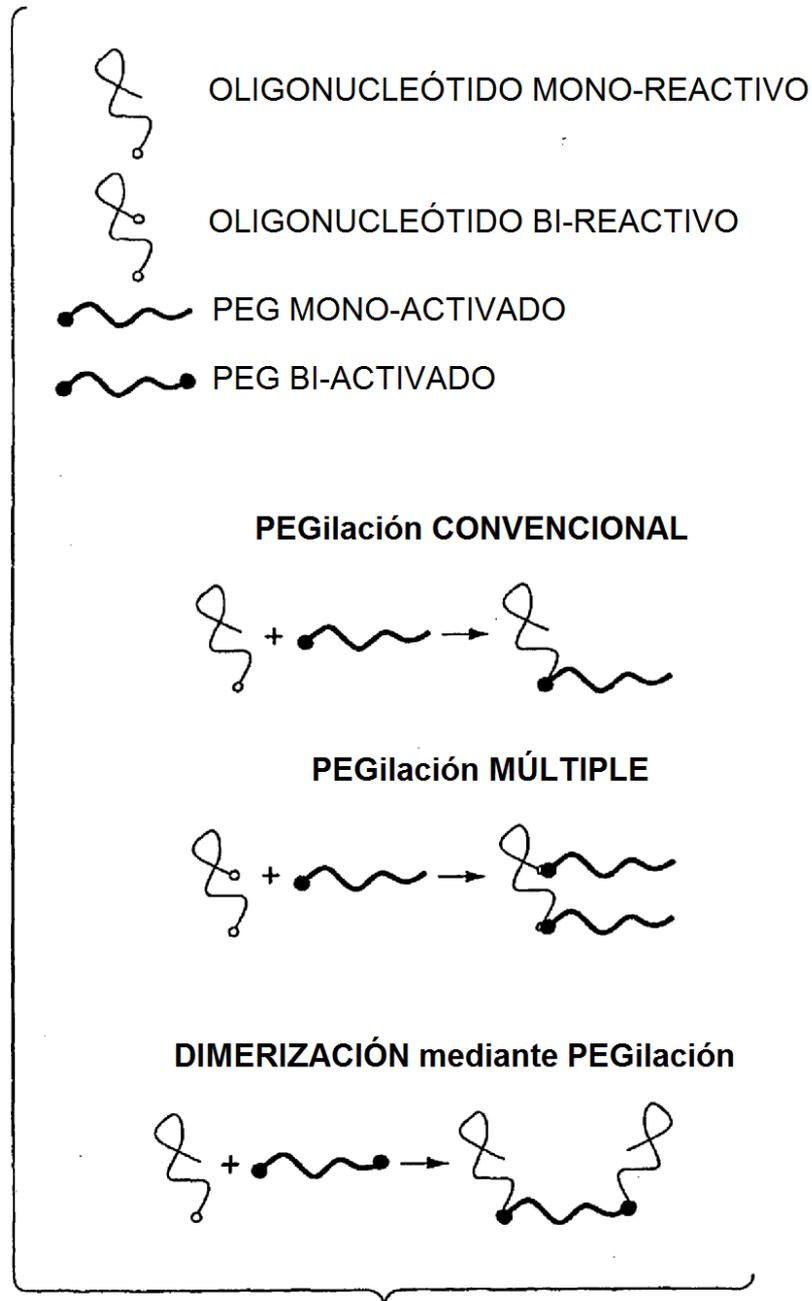


Fig. 6

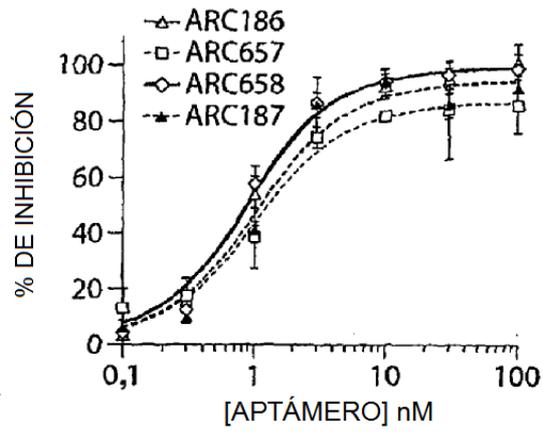


Fig. 7A

Nº de ARC	MODIFICACIÓN CON PEG	CI50 (nM)
186	SIN PEG	0,5 ± 0,1
657	ARC186+20 kDa	0,6 ± 0,1
658	ARC186+30 kDa	0,5 ± 0,1
187	1,3-BIS(mPEG-[20 kDa]) PROPIL-2-(4'-BUTAMIDA) RAMIFICADO de 40 kDa	0,6 ± 0,2

Fig. 7B

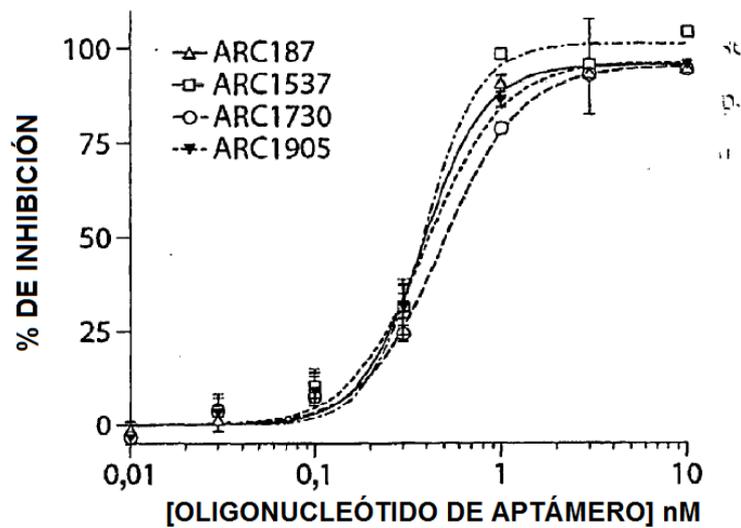


Fig. 7C

Nº de ARC	MODIFICACIÓN CON PEG	CI50 (nM)
187	1,3-BIS(mPEG-[20 kDa])- PROPIL-2-(4'-BUTAMIDA) RAMIFICADO DE 40 K	0,38 ± 0,03
1537	LINEAL DOW DE 40 K	0,39 ± 0,06
1730	2 X LINEAL DE 20 K	0,48 ± 0,04
1905	2,3-BIS-(mPEG-[20 kDa])- PROPIL-1-CARBAMOÍLO RAMIFICADO DE 40 K	0,40 ± 0,03

Fig. 7D

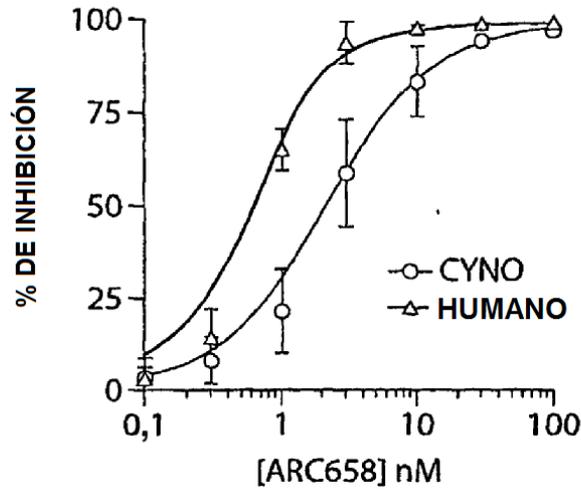


Fig. 8

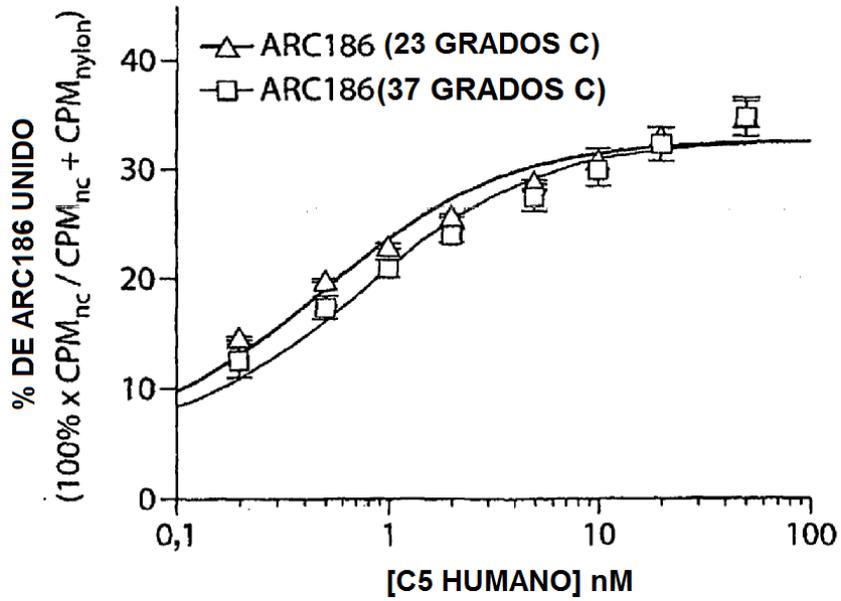


Fig. 9

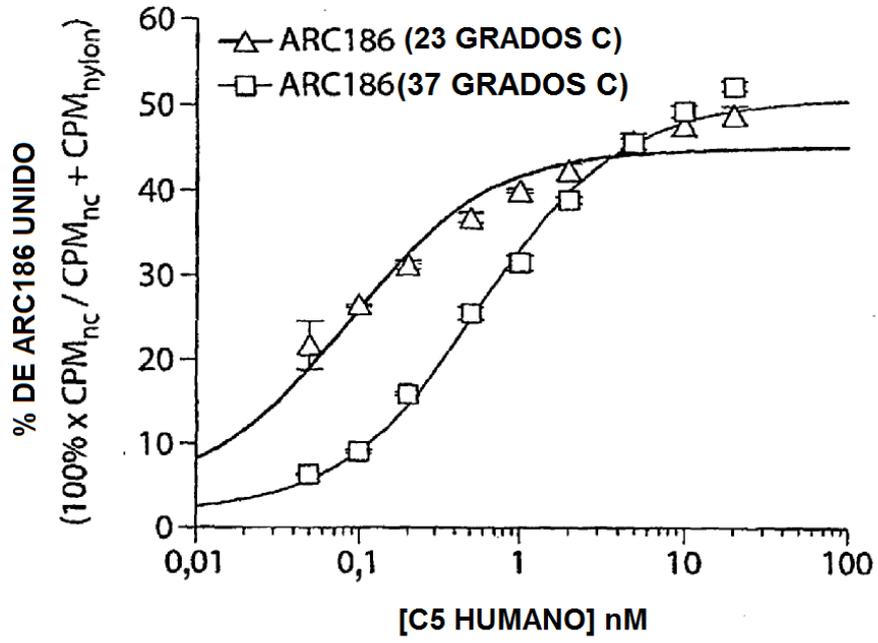


Fig. 10

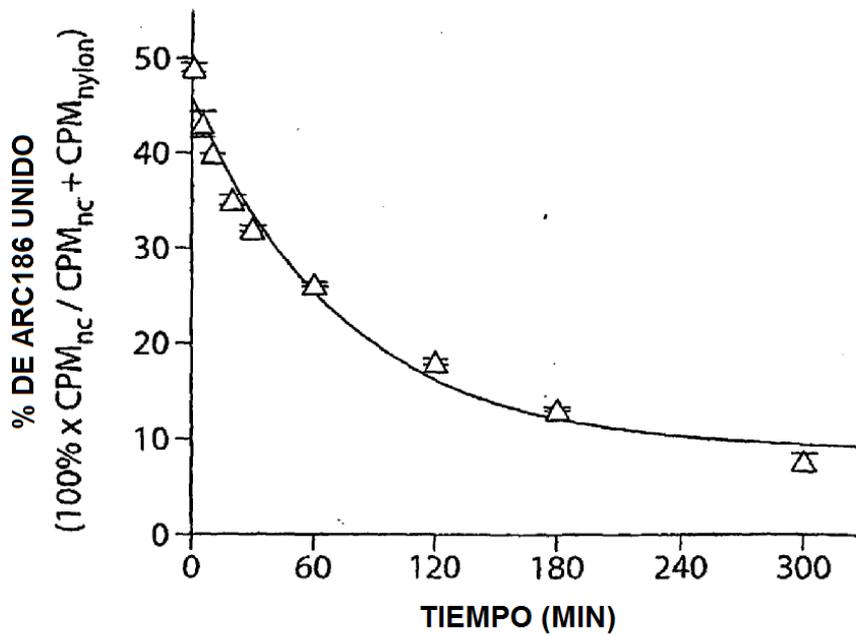


Fig. 11

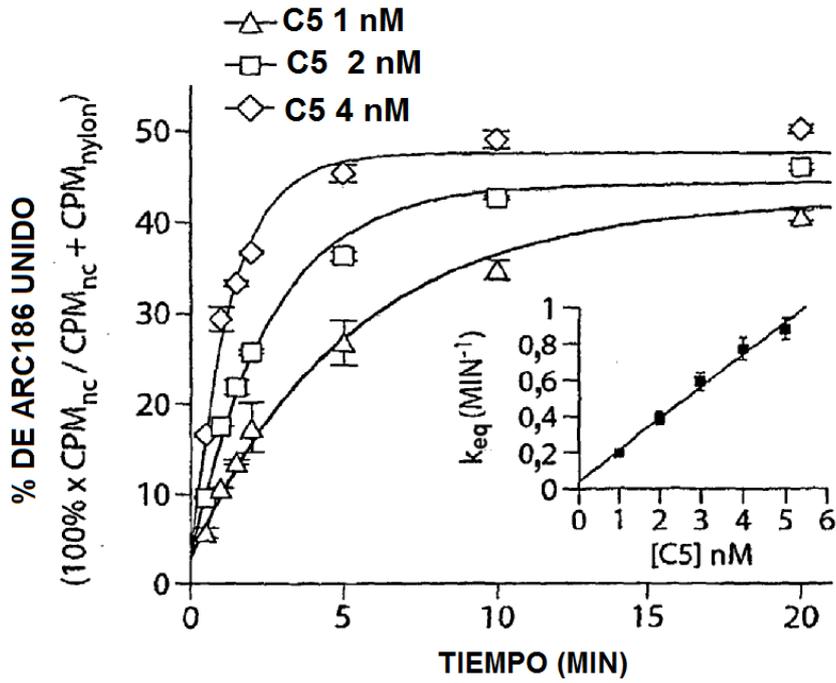


Fig. 12

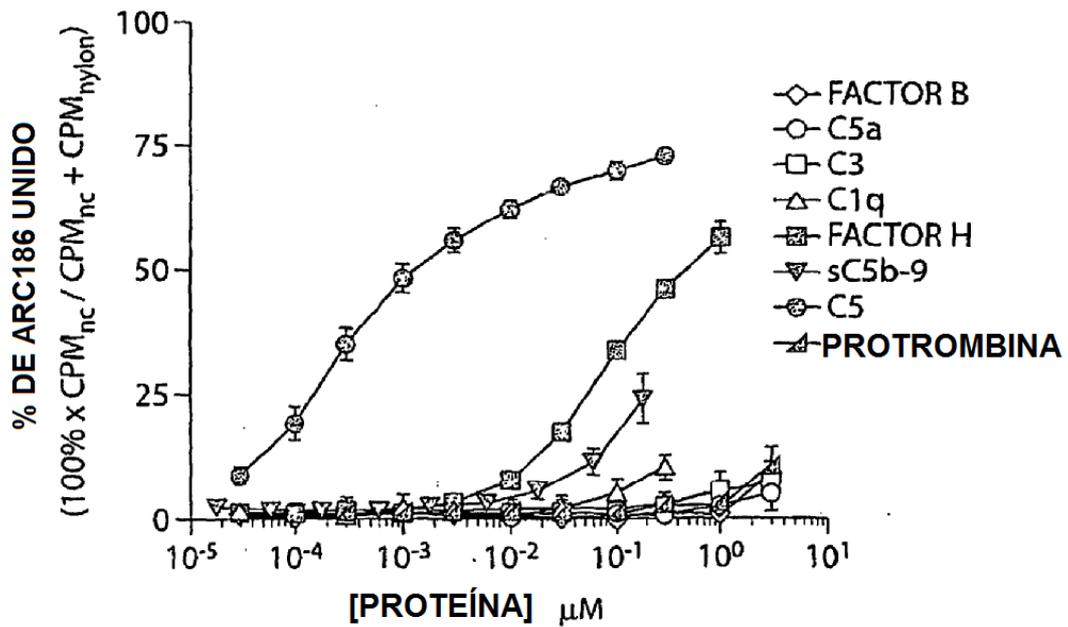


Fig. 13

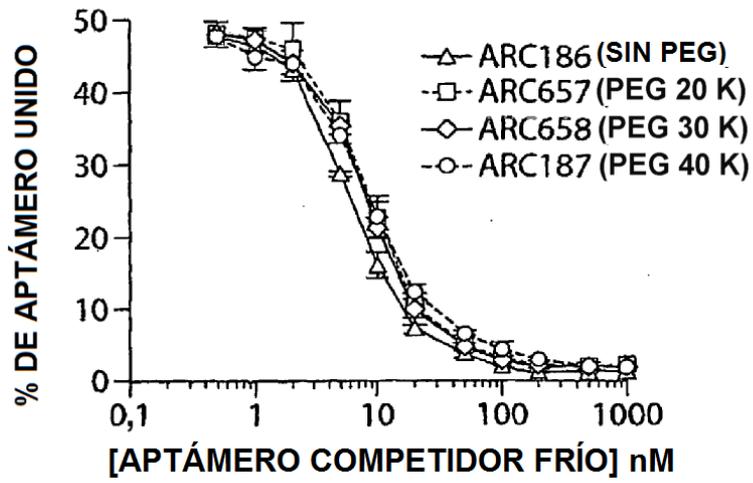


Fig. 14

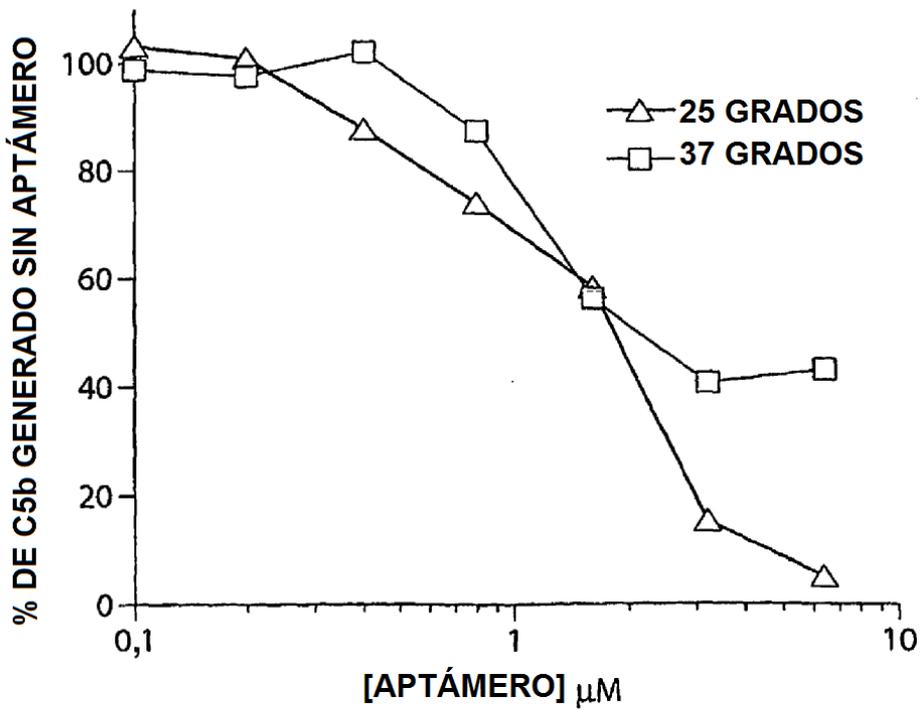


Fig. 15

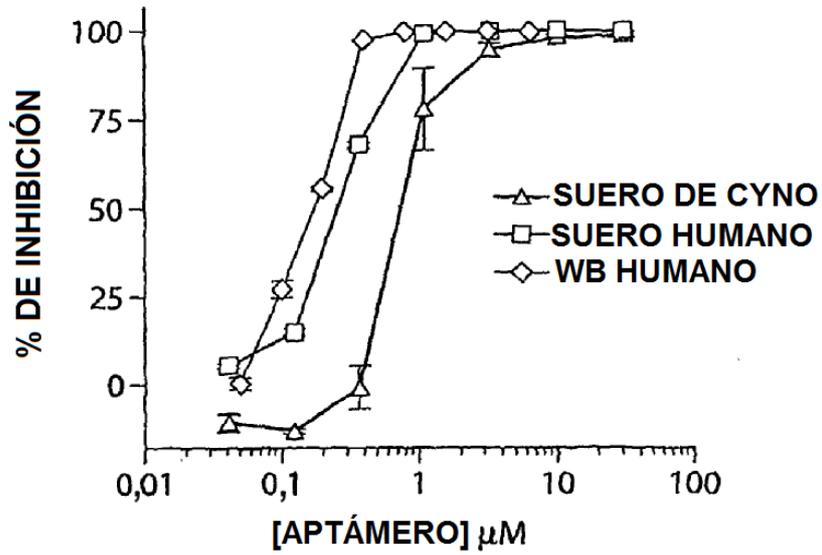


Fig. 16

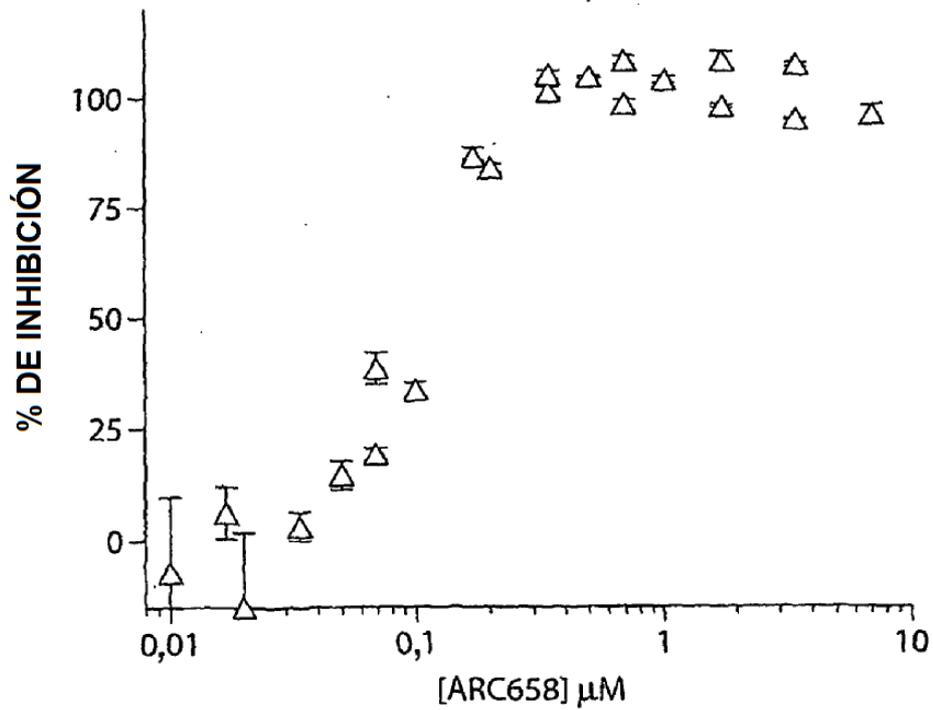


Fig. 17

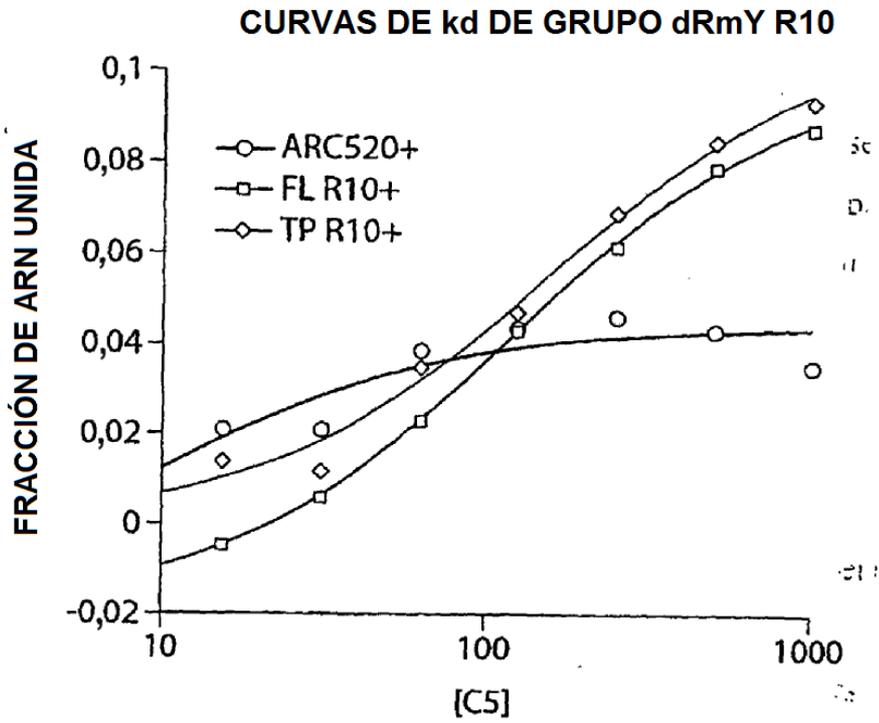


Fig. 18

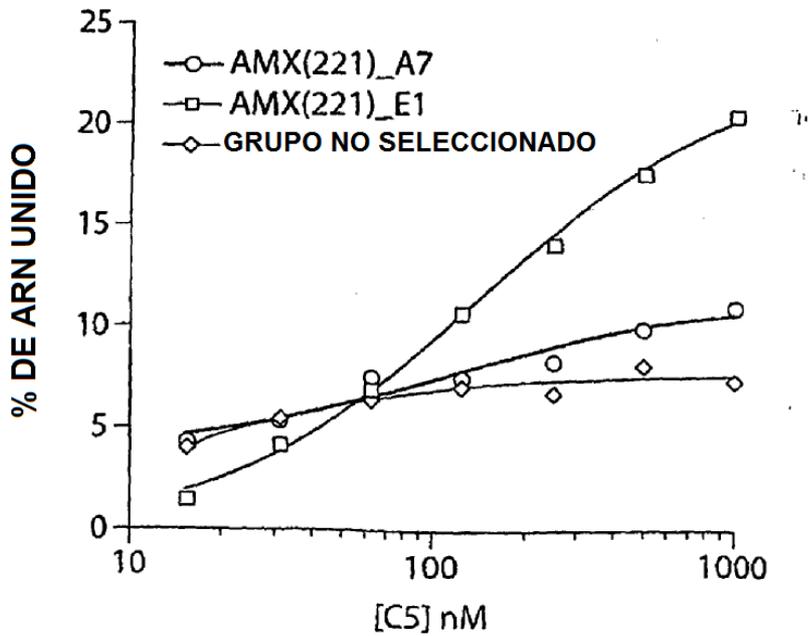


Fig. 19

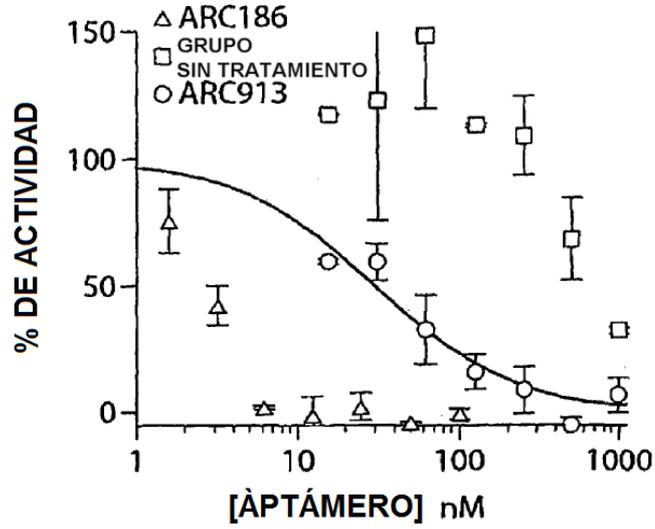


Fig. 20

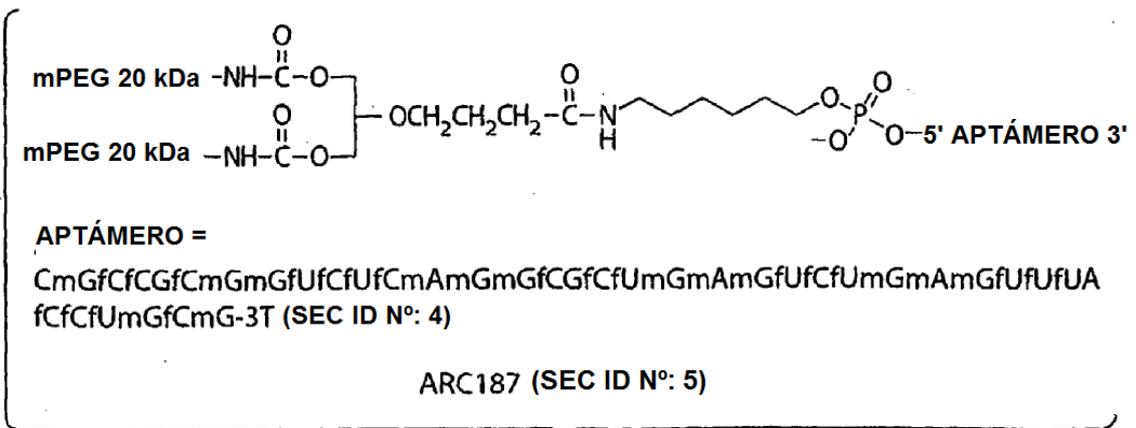


Fig. 21

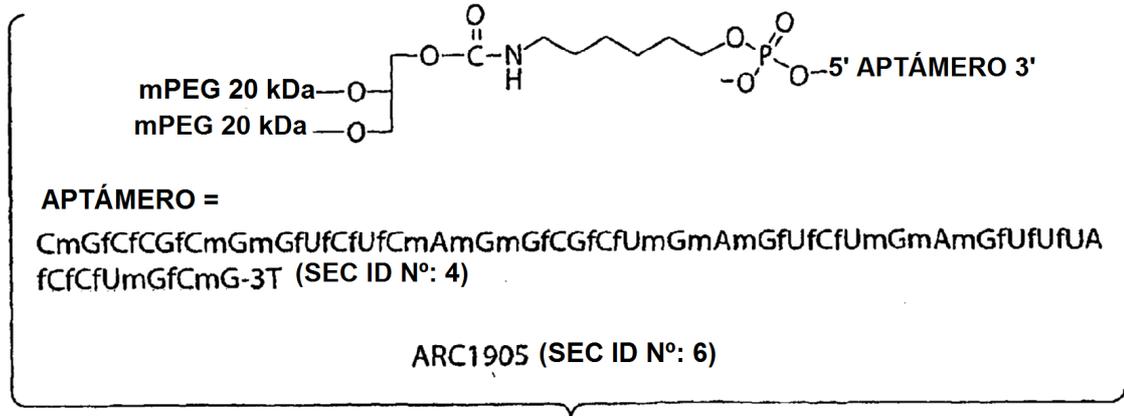


Fig. 22

GRUPO	Nº DE RATONES	ARTÍCULO DE ENSAYO	DOSIS		MEDICIONES
			CONC (nM)	VELOCIDAD DE PERFUSIÓN ml/min	
1	5	SIN APTÁMERO	0	3	FRECUENCIA CARDIACA, RITMO, PRESIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA
3	3	APTÁMERO IRRELEVANTE A RELACIÓN MOLAR 50X	1500	3	FRECUENCIA CARDIACA, RITMO, PRESIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA
4	3	ARC186 A EQUIVALENCIA MOLAR	30	3	FRECUENCIA CARDIACA, RITMO, PRESIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA
5	5	ARC186 A RELACIÓN MOLAR 10X	300	3	FRECUENCIA CARDIACA, RITMO, PRESIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA
6	4	ARC186 A RELACIÓN MOLAR 50X	1500	3	FRECUENCIA CARDIACA, RITMO, PRESIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA

Fig. 23

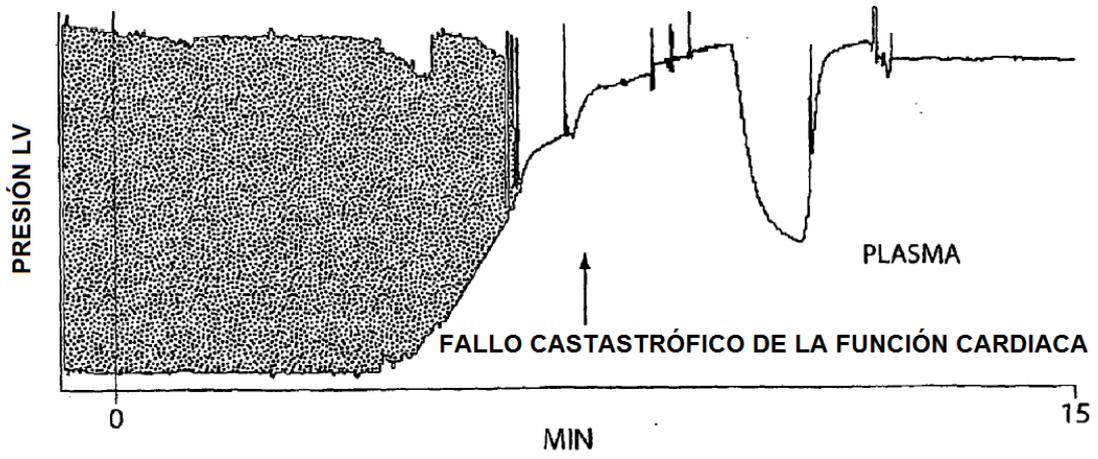


Fig. 24A

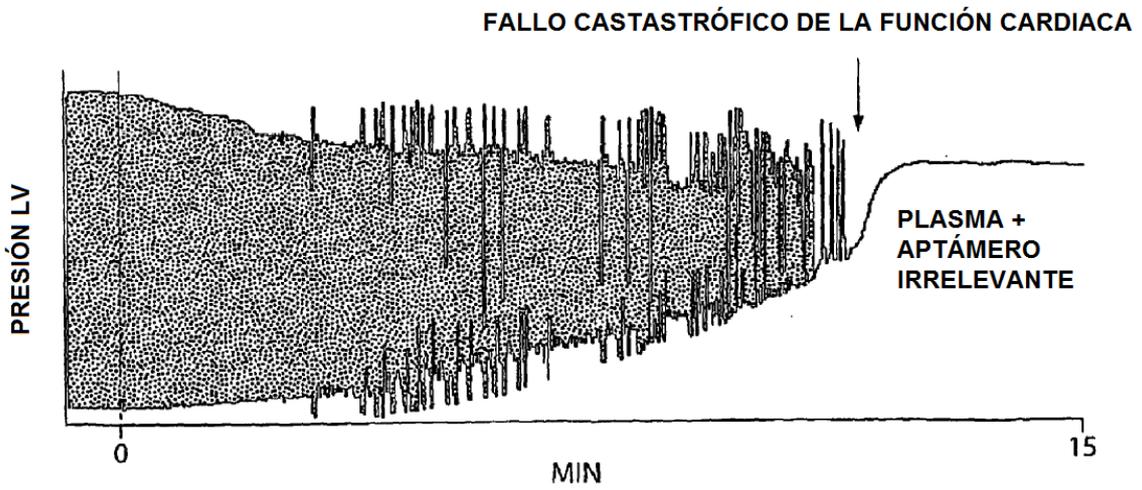


Fig. 24B

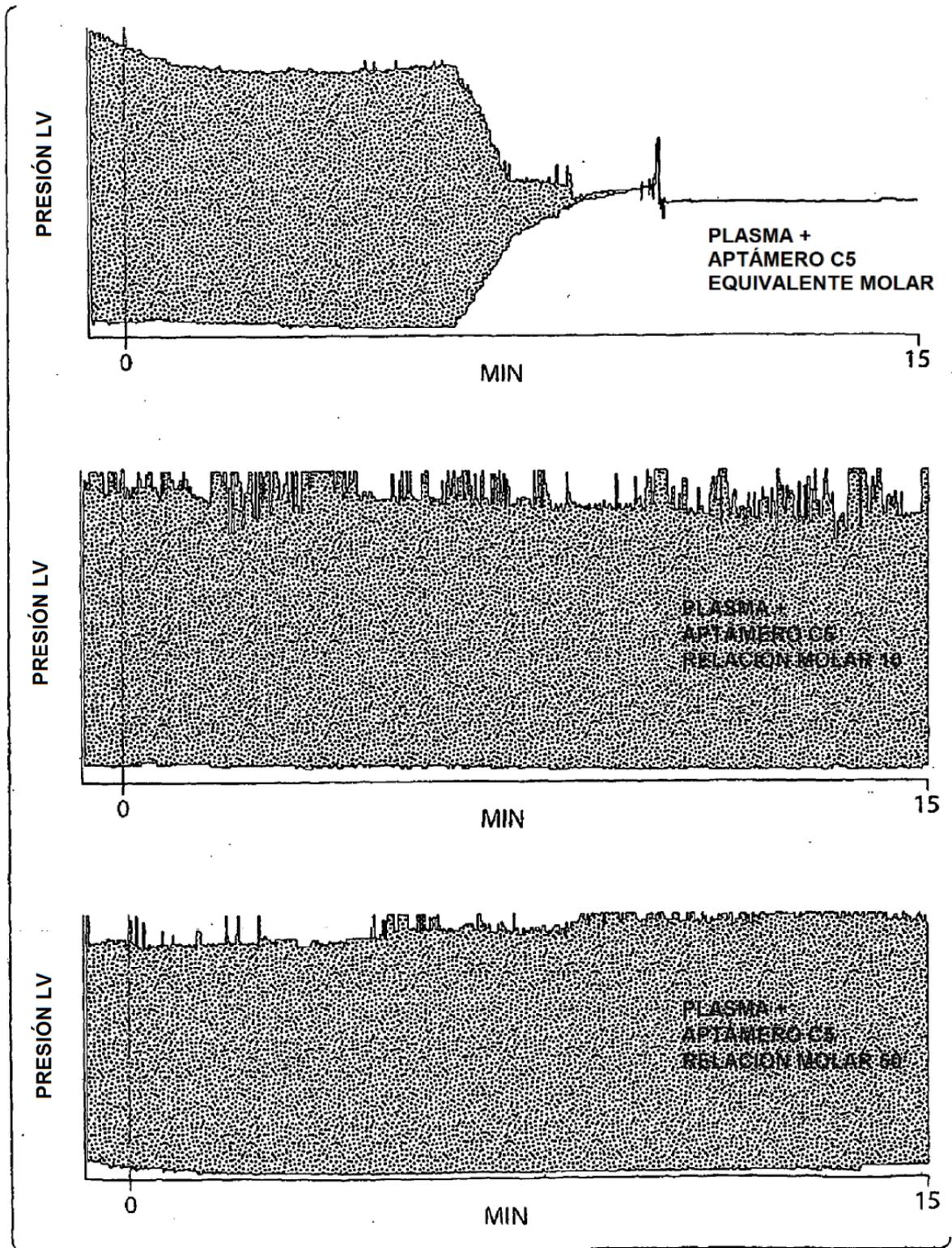


Fig. 25

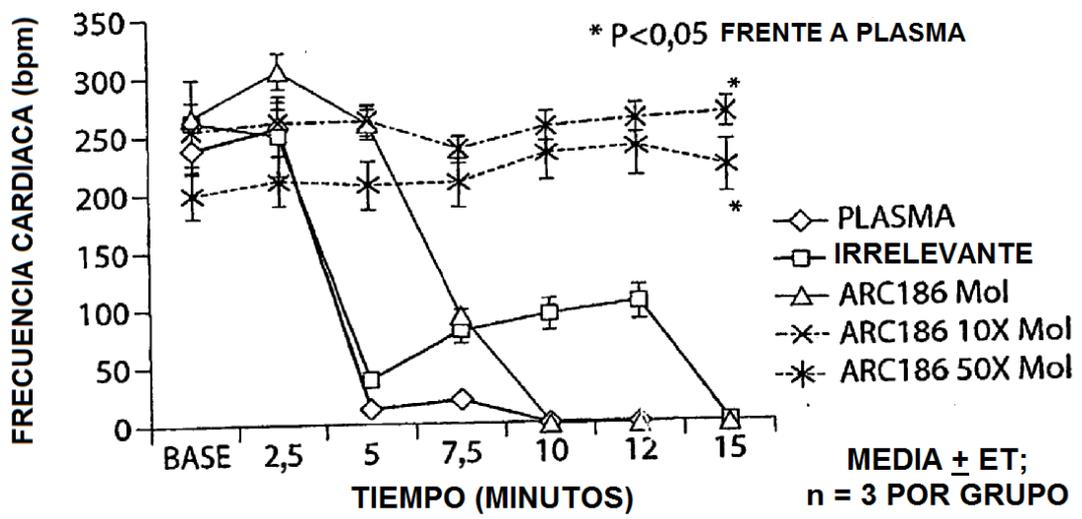


Fig. 26

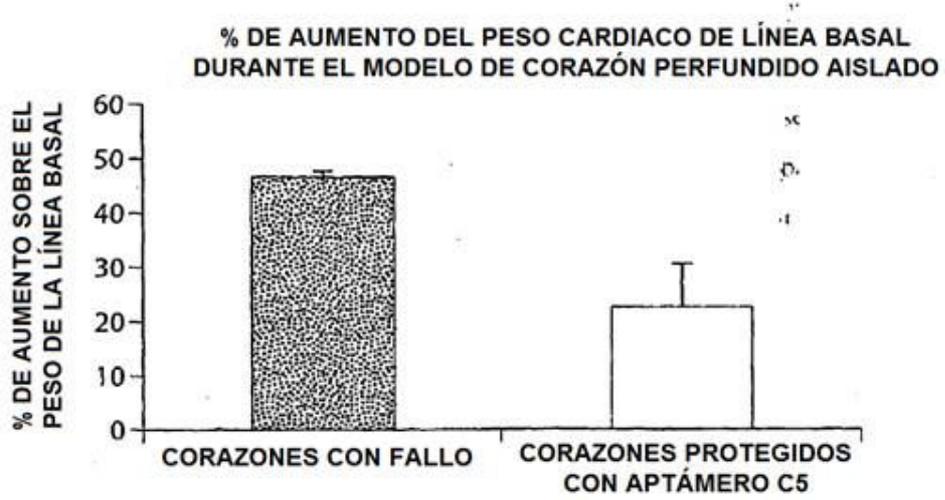


Fig. 27

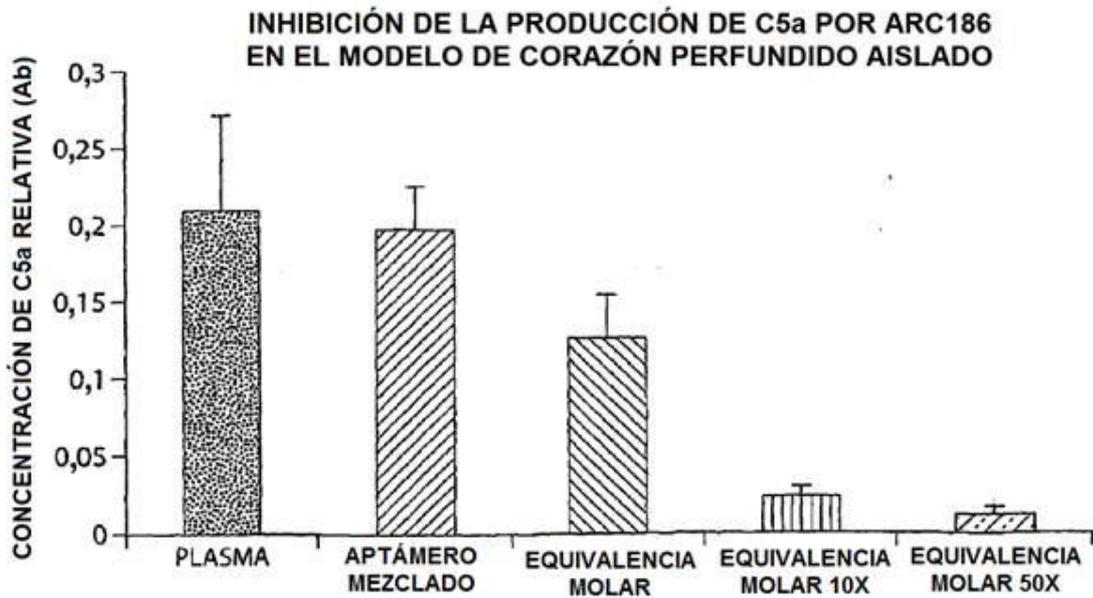


Fig. 28

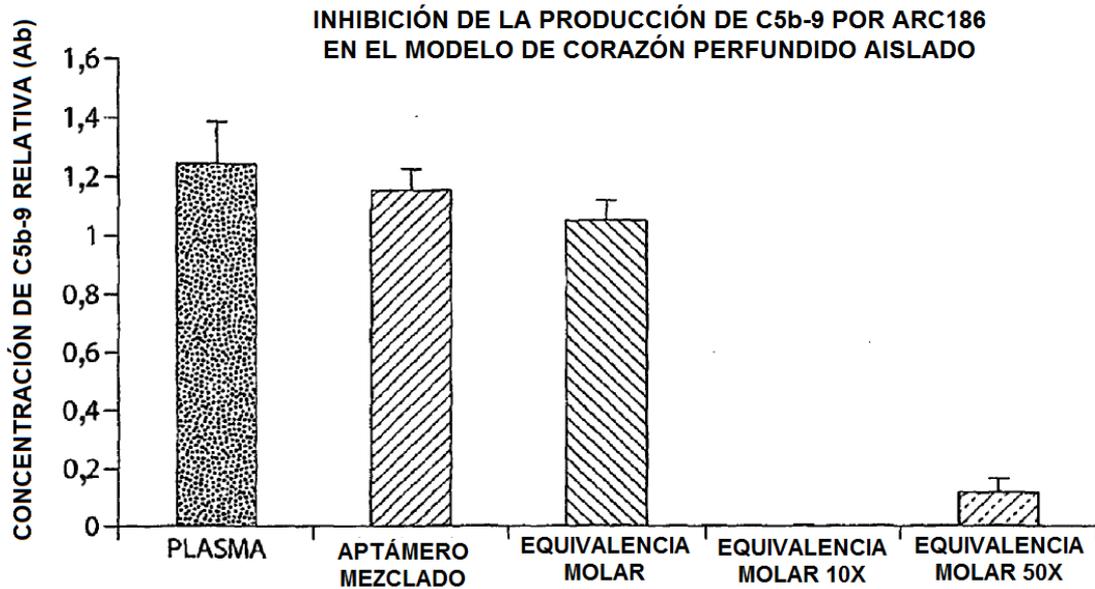


Fig. 29

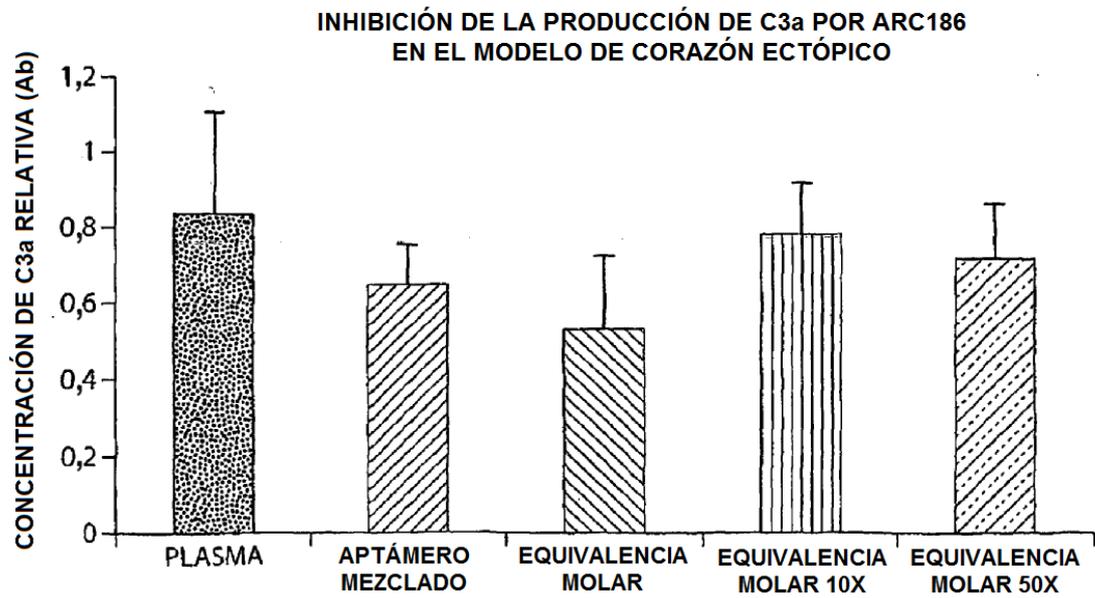


Fig. 30

ANIMAL	TRATAMIENTO	IRRELEVANTE	C3b	C5b-9
1-001 (1/26)	NINGUNO	NEG	POS	POS
1-002 (1-26)	NINGUNO	NEG	POS	POS
1-001	NINGUNO	NEG	POS	POS
1-002	NINGUNO	NEG	POS	POS
1-003	NINGUNO	NEG	POS	POS
3-001	APTÁMERO IRRELEVANTE 50 X MOLAR	NEG	POS	POS
3-002	APTÁMERO IRRELEVANTE 50X MOLAR	NEG	POS	POS
3-003	APTÁMERO IRRELEVANTE 50X MOLAR	NEG	POS	POS
4-001	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR	NEG	POS	POS
4-002	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR	NEG	POS	POS
4-003	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR	NEG	POS	POS
5-001	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 10X	NEG	POS	NEG
5-002	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 10X	NEG	POS	NEG
5-003	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 10X	NEG	POS	NEG
5-004	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 10X	NEG	POS	NEG
5-005	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 10X	NEG	POS	NEG
6-001	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 50X	NEG	POS	NEG
6-002	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 50X	NEG	POS	NEG
6-003	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 50X	NEG	POS	NEG
6-004	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 50X	NEG	POS	NEG

Fig. 31

ANIMAL	COMPUESTO	SUERO	RELACIÓN MOLAR	EDP AUMENTADO	FALLO (Sí o NO)	TIEMPO HASTA EL FALLO
1-001	ARC658	HUMANO	0	S	S	4 MIN 30S
1-002	ARC658	HUMANO	0	S	S	4 MIN 38S
1-003	ARC658	HUMANO	0	S	S	3 MIN 20 S
1-004	ARC658	HUMANO	0	S	S	12 MIN 24S
1-005	ARC658	HUMANO	0	S	N	ND
1-006	ARC658	HUMANO	0	S	S	8 MIN 30 S
1a-001	ARC658	HUMANO	0,5	S	S	7 MIN 22 S
1a-002	ARC658	HUMANO	0,5	S	S	7 MIN 30 S
1a-003	ARC658	HUMANO	0,5	S	S	8 MIN 13 S
2-001	ARC658	HUMANO	1	N	N	ND
2-002	ARC658	HUMANO	1	N	N	ND
2-003	ARC658	HUMANO	1	N	N	ND
2-004	ARC658	HUMANO	1	N	N	ND
3-001	ARC658	HUMANO	3	N	N	ND
3-002	ARC658	HUMANO	3	N	N	ND
3-003	ARC658	HUMANO	3	N	N	ND
6-001	ARC658	PRIMATE	0	S	S	2 MIN 30 S
6-002	ARC658	PRIMATE	0	S	S	2 MIN 47 S
6-003	ARC658	PRIMATE	0	S	S	3 MIN 30 S
6-004	ARC658	PRIMATE	0	S	S	1 MIN 28 S
6a-001	ARC658	PRIMATE	3	S	S	5 MIN 2 S
6a-002	ARC658	PRIMATE	3	S	S	4 MIN 30 S
6a-003	ARC658	PRIMATE	3	S	S	3 MIN 43 S
6a-004	ARC658	PRIMATE	3	S	S	8 MIN 0 S
7-001	ARC658	PRIMATE	10	S	N	ND
7-002	ARC658	PRIMATE	10	S	N	ND
7-003	ARC658	PRIMATE	10	S	S	9 MIN 15 S
7-004	ARC658	PRIMATE	10	S	N	ND
9-001	ARC658	PRIMATE	20	S	S	12 MIN 50 S
11-001	ARC658	PRIMATE	30	S	N	ND
11-002	ARC658	PRIMATE	30	S	S	10 MIN 0 S
11-003	ARC658	PRIMATE	30	S	N	ND
13-001	ARC658	PRIMATE	50	N	N	ND
13-002	ARC658	PRIMATE	50	N	N	ND
13-003	ARC658	PRIMATE	50	N	N	ND

Fig. 32

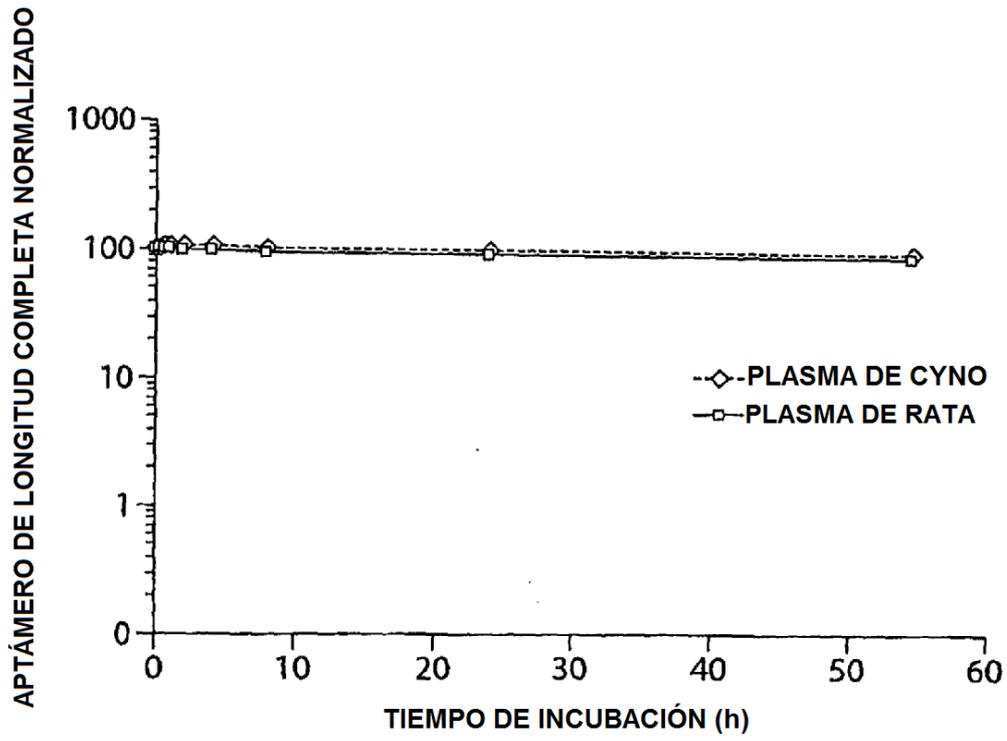


Fig. 33

NÚMERO DE GRUPO	NÚMERO DE ANIMAL	ARTÍCULO DE ENSAYO	NIVEL DE DOSIFICACIÓN (mg/kg)	VOLUMEN DE DOSIFICACIÓN (ml/kg)	REGIMEN DE DOSIFICACIÓN	RECOGIDA DE MUESTRAS
1	3	ARC657 PEG 20 kDa	10	1	EMBOLADA INTRAVENOSA EL DÍA 1	t=PRE-DOSIS, 0, 5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 h
2	3	ARC658 PEG 30 kDa	10	1	EMBOLADA INTRAVENOSA EL DÍA 1	t=PRE-DOSIS, 0, 5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 h
3	3	ARC187 PEG 40 kDa	10	1	EMBOLADA INTRAVENOSA EL DÍA 1	t=PRE-DOSIS, 0, 5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 h

Fig. 34

PK DE CONJUGADOS DE APTÁMERO ANTI-C5 PEG EN RATA SPRAGUE-DAWLEY						
APTÁMERO	ARC657		ARC658		ARC187	
GRUPO DE PEG	20 kDa		30 kDa		40 kDa	
	MEDIA	DT	MEDIA	DT	MEDIA	DT
TIEMPO (h)	Cp (µM)					
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	12,77	2,67	2,97	0,62	6,52	1,77
1	13,38	2,08	4,09	1,44	7,94	1,08
2	6,63	1,87	3,40	0,66	6,57	1,56
4	2,38	0,87	2,22	0,39	4,56	0,54
8	0,72	0,18	2,87	1,84	1,53	0,57
12	0,31	0,03	0,60	0,09	1,45	0,17
24	<LLOQ	<LLOQ	0,47	0,17	0,73	0,03
32	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	0,49	0,01
48	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	0,27	0,02

Fig. 35

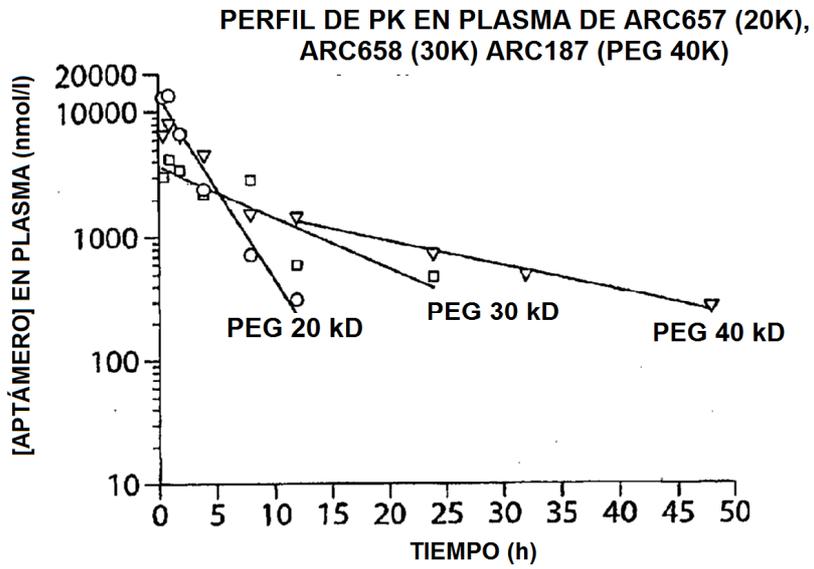


Fig. 36

ESPECIE	DOSIS (mg/kg)	VÍA DE ADMINIS.	GRUPO DE PEG	C _{máx} (µg/ml)	AUC _{0-∞} (µg_h/ml)	T _{1/2} (α) (h)	T _{1/2} (β) (h)	Cl (ml/min_kg)	V _{ss} (ml/kg)
RATA	10	IV	20 kD	169,97	458	-	2,05	0,36	65
RATA	10	IV	30 kD	52,00	497	-	7,40	0,34	220
RATA	10	IV	40 kD	100,85	886	-	15,00	0,19	188

Fig. 37

Nº DE GRUPO	Nº DE ANIMALES	ARTÍCULO DE ENSAYO	DOSIS		VÍA DE DOSIS	RECOGIDA DE MUESTRAS
			(mg/kg)	(ml/kg)		
1	33F	ARC187	10	4	IV	t=PRE-DOSIS, 0, 5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72 h
2	33F	ARC1905	10	4	IV	t=PRE-DOSIS, 0, 5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72 h

Fig. 38A

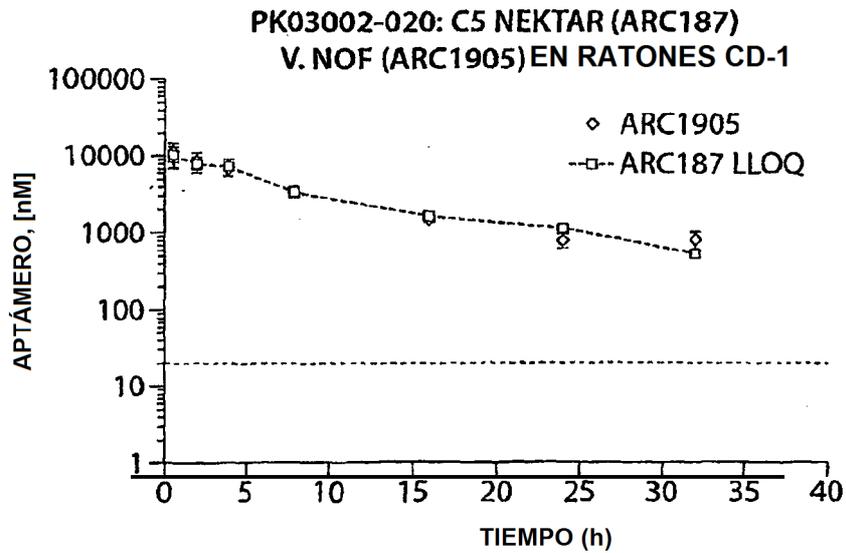


Fig. 38B

ANÁLISIS DE PK NO COMPARTIMENTAL (NCA)			
ATRIBUTO	UNIDAD	ARC1905	ARC187
C_{máx}	μM	12	10
AUC_{0-∞}	μM-h	88	89
MRT_{0-∞}	h	11	11
CL	ml/min.kg	0,15	0,15
V_{ss}	ml/kg	95	96
K₁₀	1/h	0,151	0,121
t_{1/2} (K₁₀)	h	5	6

Fig. 38C

APTÁMERO	PRE	1 h	3 h	6 h
ARC657	NO	SÍ	SÍ	SÍ
ARC658	NO	SÍ	SÍ	SÍ
ARC187	NO	SÍ	SÍ	SÍ

Fig. 39

NÚMERO DE GRUPO	NÚMERO DE ANIMALES	ARTÍCULO DE ENSAYO	NIVEL DE DOSIFICACIÓN (mg/kg)	VOLUMEN DE DOSIFICACIÓN (ml/kg)	REGIMEN DE DOSIFICACIÓN	RECOGIDA DE MUESTRAS
1	1	ARC657 PEG 20 kDa	30	3	EMBOLADA INTRAVENOSA EL DÍA 1	t=PRE-DOSIS, 1, 5, 10, 15, Y 30 MINUTOS Y A 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, Y 192 H
2	1	ARC658 PEG 30 kDa	30	3	EMBOLADA INTRAVENOSA EL DÍA 1	t=PRE-DOSIS, 1, 5, 10, 15, Y 30 MINUTOS Y AT1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, Y 192 H
3	1	ARC187 PEG 40 kDa	30	3	EMBOLADA INTRAVENOSA EL DÍA 1	t=PRE-DOSIS, 1, 5, 10, 15, Y 30 MINUTOS Y A 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, Y 192 H

Fig. 40

PK DE CONJUGADOS DE APTÁMERO ANTI-C5 -PEG EN MACACO CYNOMOLGUS			
APTÁMERO	ARC657	ARC658	ARC187
GRUPO DE PEG	20 kDa	30 kDa	40 kDa
	MEDIA	MEDIA	MEDIA
TIEMPO (HORAS)	Cp (µM)	Cp (µM)	Cp (µM)
0	0,00	0,00	0,00
0,08	16,41	21,99	18,00
0,25	16,64	22,67	17,26
0,5	19,38	26,16	24,17
1	19,36	27,08	21,79
4	7,73	14,16	21,69
8	2,03	6,02	16,68
12	1,10	3,04	13,11
24	0,36	0,95	7,24
48	0,15	0,42	2,30
72	0,07	0,25	0,96
96	0,03	0,23	0,54
192	0,01	0,04	0,14

Fig. 41

ESPECIE	DOSIS (mg/kg)	VIA DE ADMIN.	GRUPO DE PEG	C _{máx} (µg/ml)	AUC _{0-∞} (µg_h/ml)	T _{1/2} (α) (h)	T _{1/2} (β) (h)	Cl (ml/min_kg)	V _{ss} (ml/kg)
PRIMATE	30	IV	20 kD	293	1191	2,35	31,80	0,41	273
PRIMATE	30	IV	30 kD	385	2484	3,33	40,08	0,20	233
PRIMATE	30	IV	40 kD	316	6752	12,38	60,11	0,07	141

Fig. 42

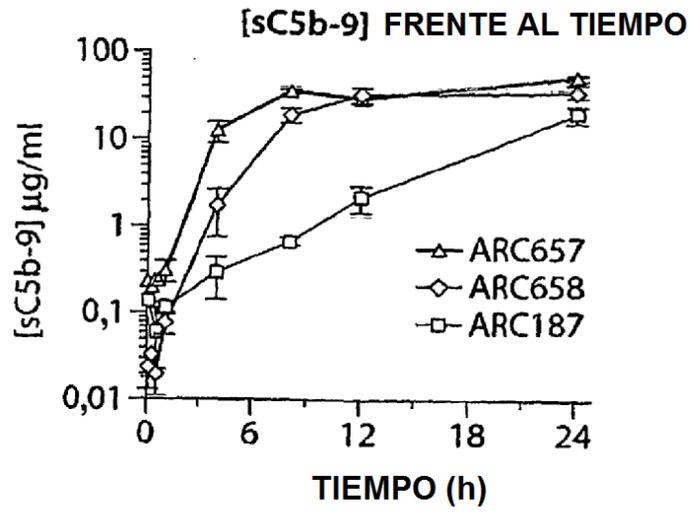


Fig. 43A

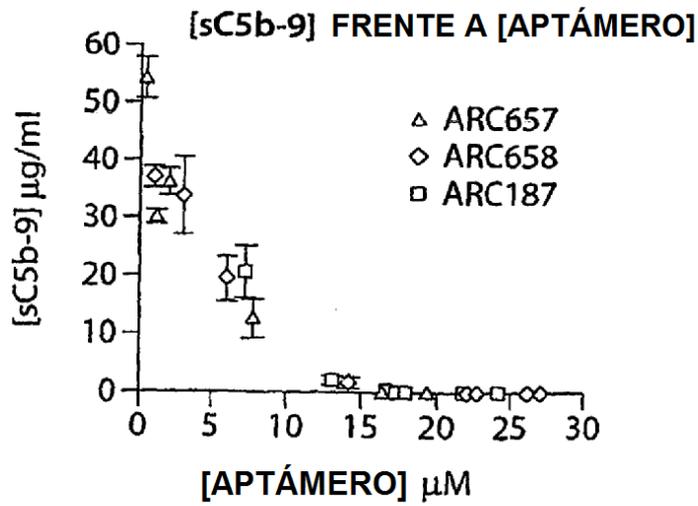


Fig. 43B

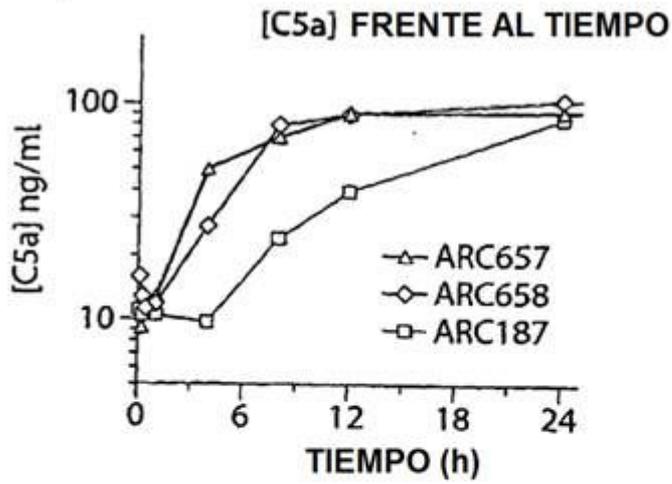


Fig. 43C

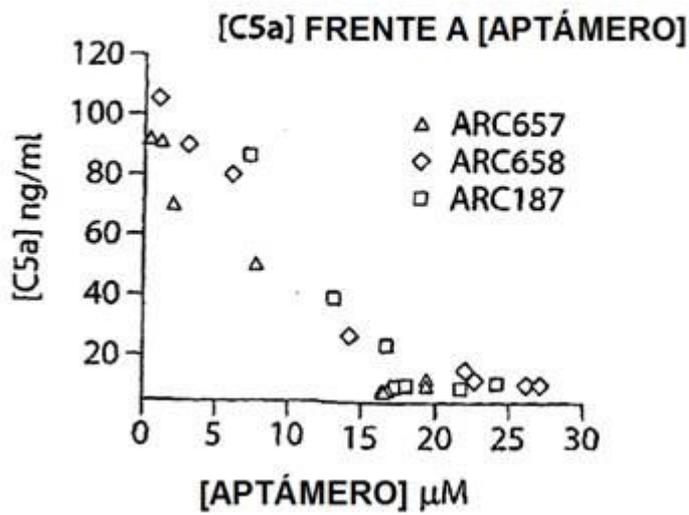


Fig. 43D

NÚMERO DE GRUPO	NÚMERO DE ANIMALES	ARTÍCULO DE ENSAYO	NIVEL DE DOSIFICACIÓN (mg/kg)	VOLUMEN DE DOSIFICACIÓN (ml/kg)	RÉGIMEN DE DOSIFICACIÓN	RECOGIDA DE MUESTRAS
1	4	ARC658 PEG 30 kDa	30	3	EMBOLADA INTRAVENOSA EL DÍA 1	t=PRE-DOSIS, 5, 10, 15, Y 30 MINUTOS Y A 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 144 Y 192 H
2	4	ARC187 PEG 40 kDa	30	3	EMBOLADA INTRAVENOSA EL DÍA 1	t=PRE-DOSIS, 5, 10, 15, Y 30 MINUTOS Y A 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 144 Y 192 H

Fig. 44

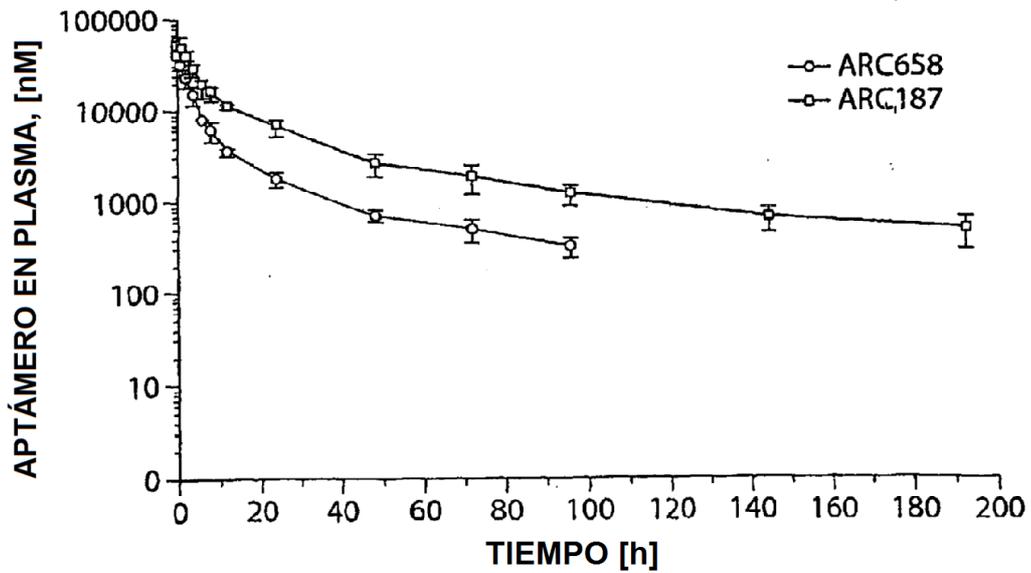


Fig. 45

ESPECIE	DOSIS (mg/kg)	VÍA DE ADMINIST.	GRUPO DE PEG	C _{máx} (µg/ml)	AUC _{0-∞} (µg_h/ml)	T _{1/2} (α) (h)	T _{1/2} (β) (h)	Cl (ml/min_kg)	V _{ss} (ml/kg)
PRIMATE	30	IV	30 kD	519	3059	2,35	30,45	0,16	213
PRIMATE	30	IV	40 kD	609	8061	4,48	53,13	0,06	168

Fig. 46

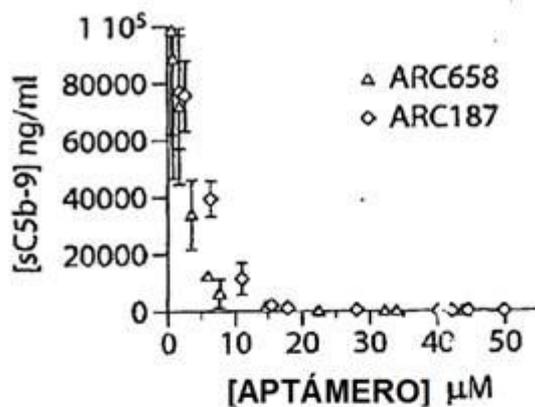


Fig. 47

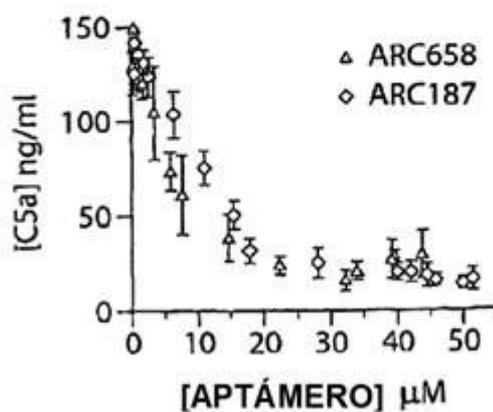


Fig. 48

NÚMERO DE GRUPO	NÚMERO DE ANIMALES	ARTÍCULO DE ENSAYO	NIVEL DE DOSIFICACIÓN (mg/kg)	CONCENTRACIÓN DE DOSIS (ml/kg)	VOLUMEN DE DOSIS	REGIMEN DE DOSIFICACIÓN	ÚLTIMO DÍA DE ENSAYO
1	3	ARC187	EMBOLADA IV 1 mg/kg E INFUSIÓN IV 0,0013 mg/kg/min	10	EMBOLADA IV 0,1 ml/kg E INFUSIÓN IV 0,1872 ml/kg/día	EMBOLADA IV E INFUSIÓN DE 48 HORAS EL DÍA 1	DÍA 8

Fig. 49

ESPECIE	DOSIS (mg/kg)	VÍA DE ADMINIST.	GRUPO DE PEG	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}_h\text{/ml}$)	$T_{1/2}(\alpha)$ (h)	$T_{1/2}(\beta)$ (h)	Cl (ml/min_kg)	V_{ss} (ml/kg)
PRIMATE	30	IV	40 kD	610	8061	4,48	53,13	0,06	168

Fig. 50

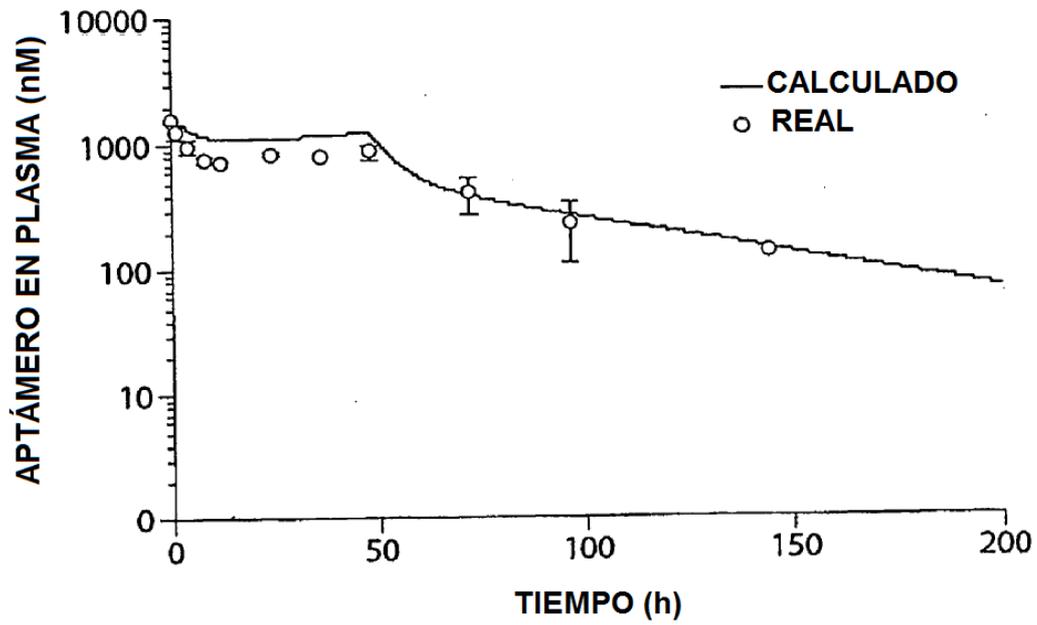


Fig. 51

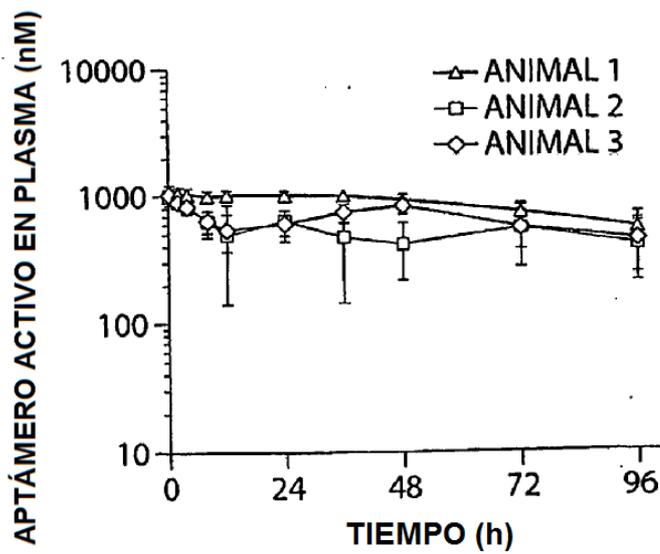


Fig. 52

APTÁMERO	GRUPO DE PEG	PESO MOLECULAR (OLIGO)	PESO MOLECULAR (TOTAL)	t _{1/2} (α) (h)	t _{1/2} (β) (h)	DOSIS TOTAL (OLIGO) PARA 1,5 μM (g)
ARC187	40 kDa	12.703	52.703	4,48	53,13	0,40

Fig. 53

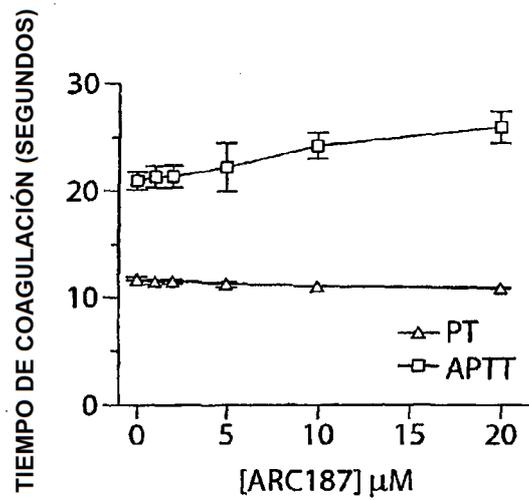


Fig. 54

TRATAMIENTO	ACT (SEGUNDOS)		
	DONANTE 1 ^a	DONANTE 2 ^b	DONANTE 3 ^b
LÍNEA BASAL	133 ± 30	145 ± 12	138 ± 1
+ HEPARINA	842 ± 95	519 ± 16	450 ± 15
+ HEPARINA Y ARC187	Nd	618 ± 55	492 ± 28
+ HEPARINA Y PROTAMINA	160 ± 11	155 ± 6	159 ± 9
+ HEPARINA, PROTAMINA Y ARC187	200 ± 5	172 ± 1	169 ± 8

^a HEPARINA 5 U/ml; ^b HEPARINA 4 U/ml; nd; NO DETERMINADO

Fig. 55

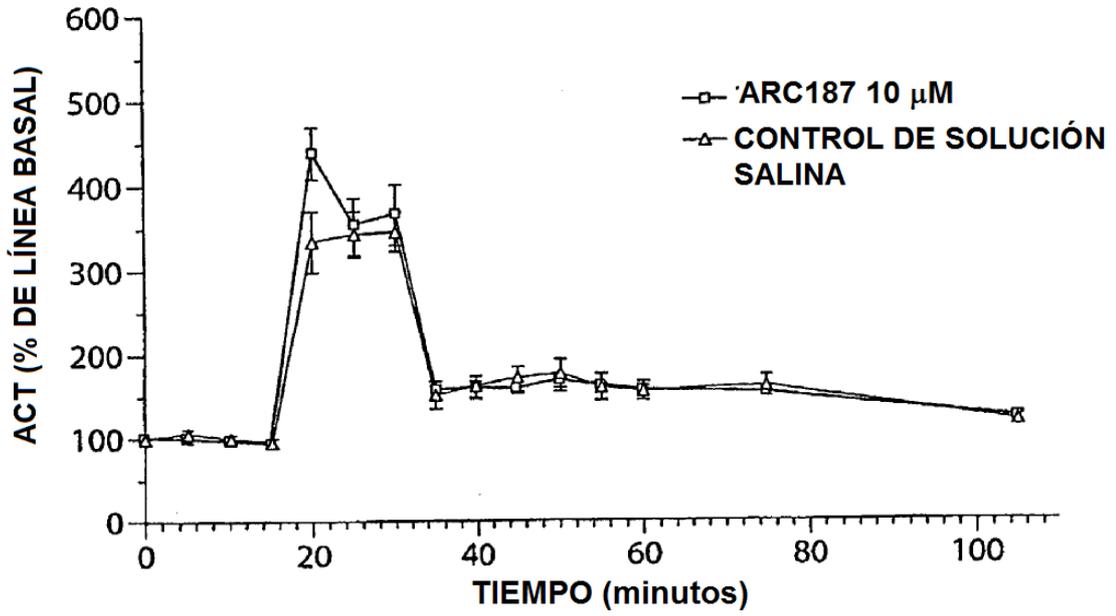


Fig. 56

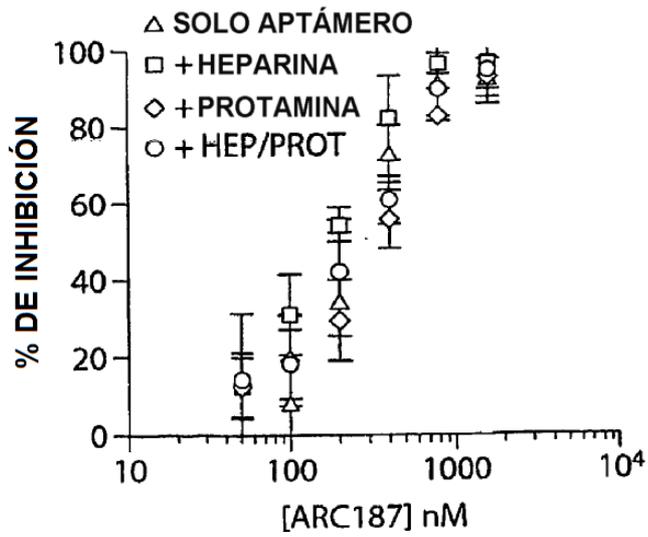


Fig. 57

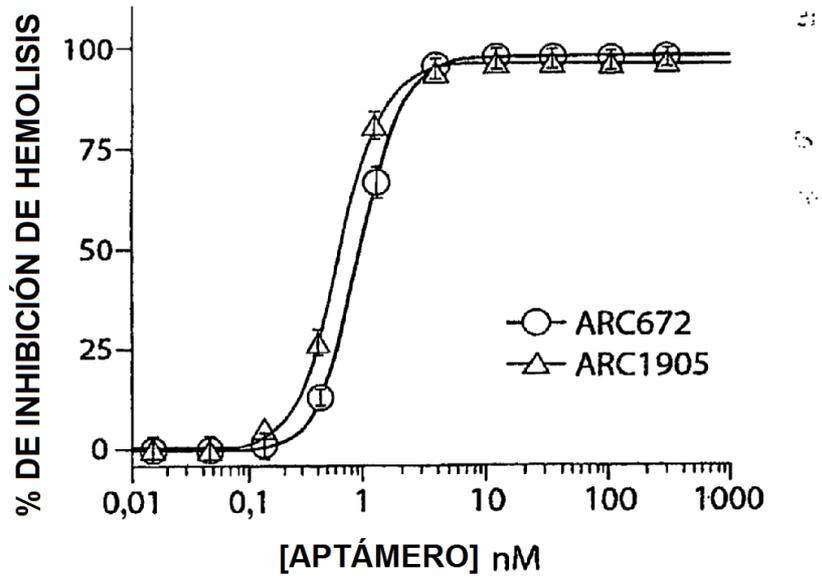


Fig. 58

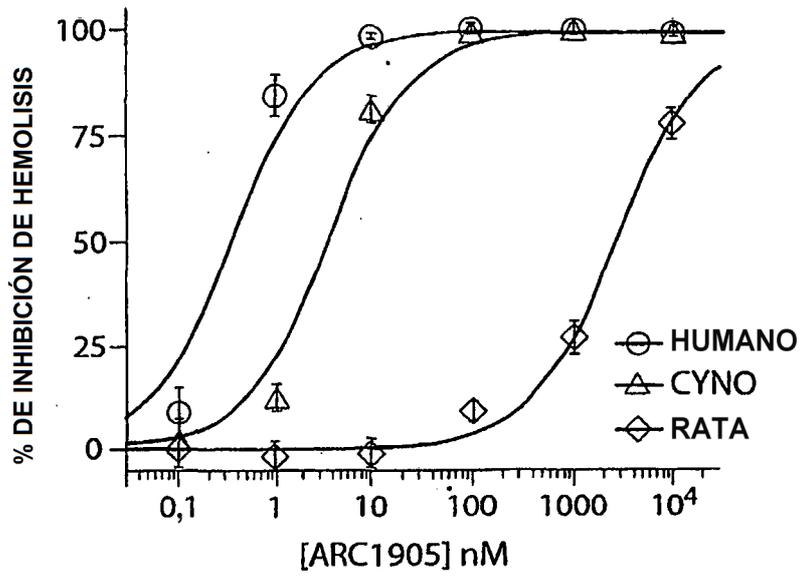


Fig. 59A

Especie del suero	Cl ₅₀ de ARC1905 (nM)	Cl ₅₀ de ARC127 (nM)
Humano	0,349 ±0,0898	> 10.000 ND
Mono Cynomolgus	3,69 ±0,603	> 10.000 ND
Rata	2700 ±470	~10.000 ND

Fig. 59B

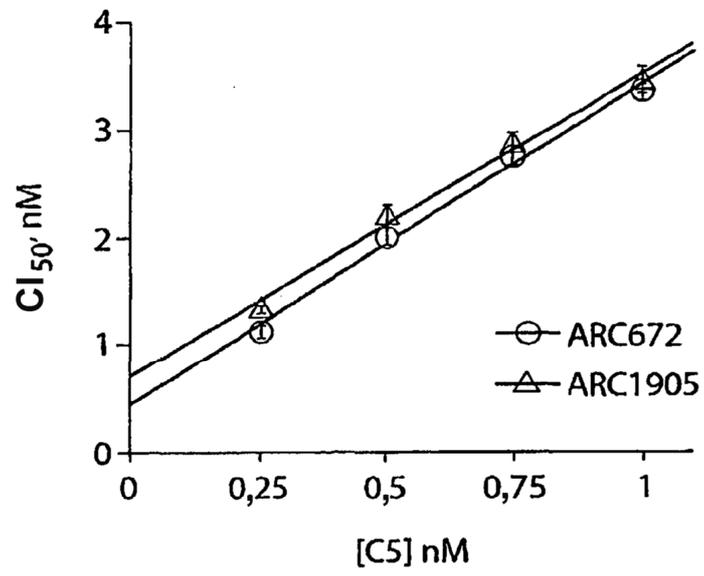


Fig. 60

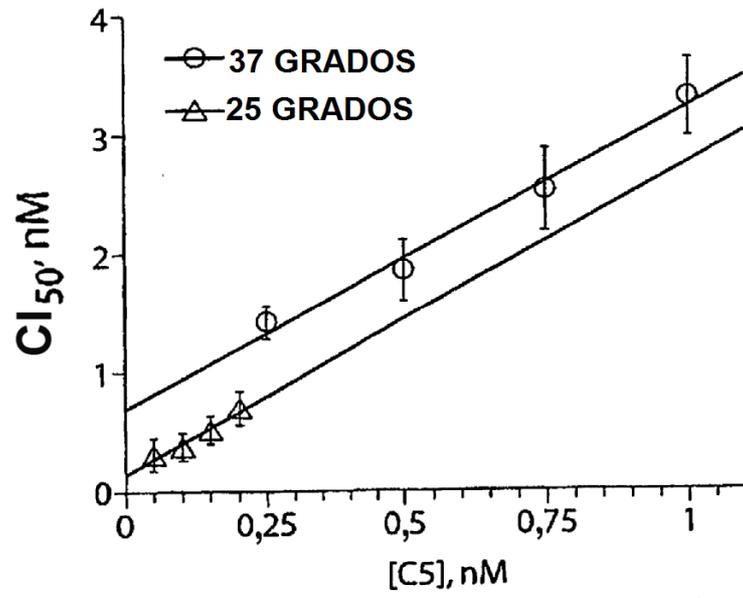


Fig. 61

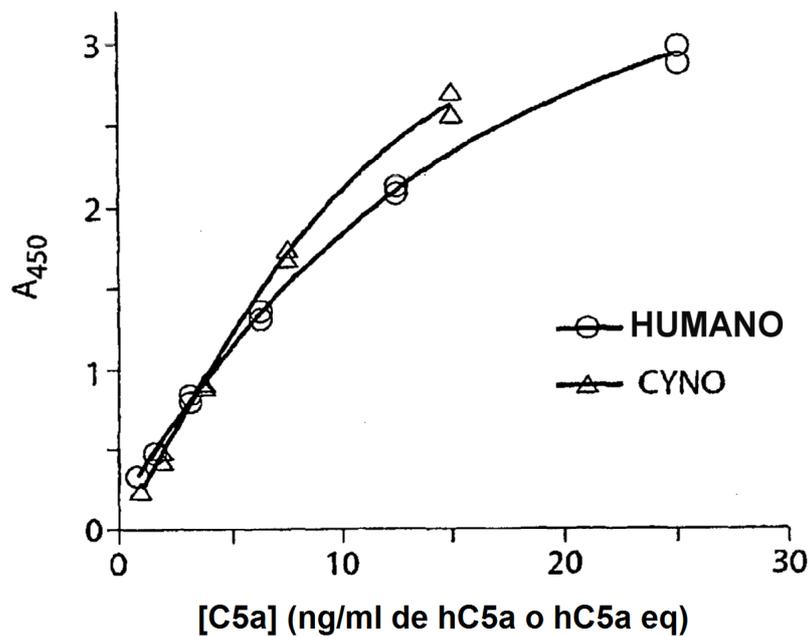


Fig. 62

Aptámero	Cl ₅₀ (nM)	Cl ₉₀ (nM)	Cl ₉₉ (nM)
Ser humano	196 ±13,9	442 ±23,2	1090 ±198,0
Macaco Cynomolgus	536 ±54,7	1810 ±405,8	6900 ±2600
Relación cyno/ser humano	2,73 ±0,339	4,1 ±0,94	6,4 ±2,65

Fig. 63

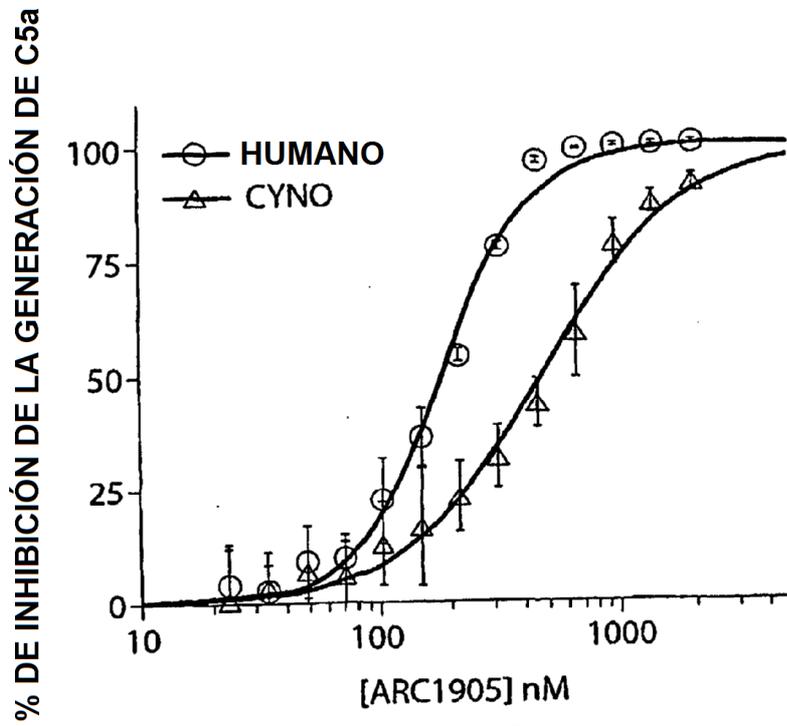


Fig. 64

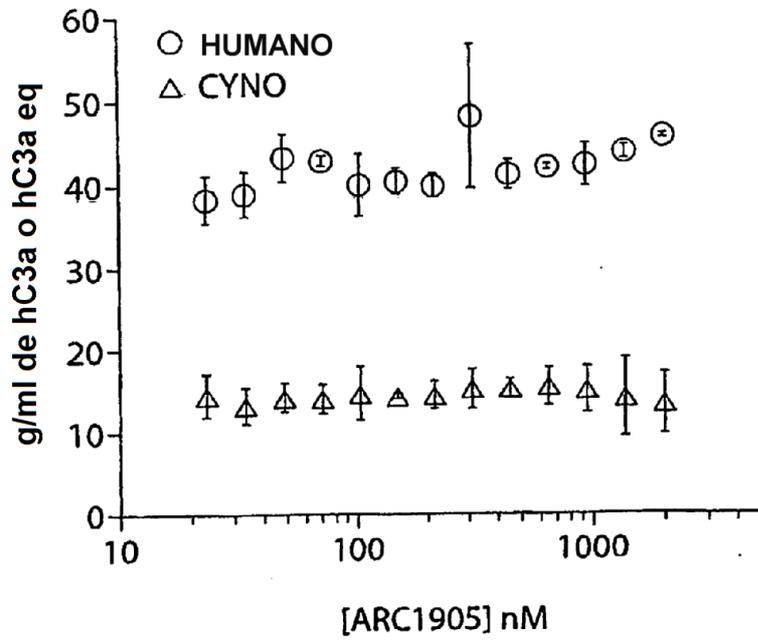


Fig. 65

Donante	Cl ₅₀ (nM)	Cl ₉₀ (nM)	Cl ₉₉ (nM)
Media de 5 donantes	119	268	694
DT	28,6	39,2	240,9

Fig. 66

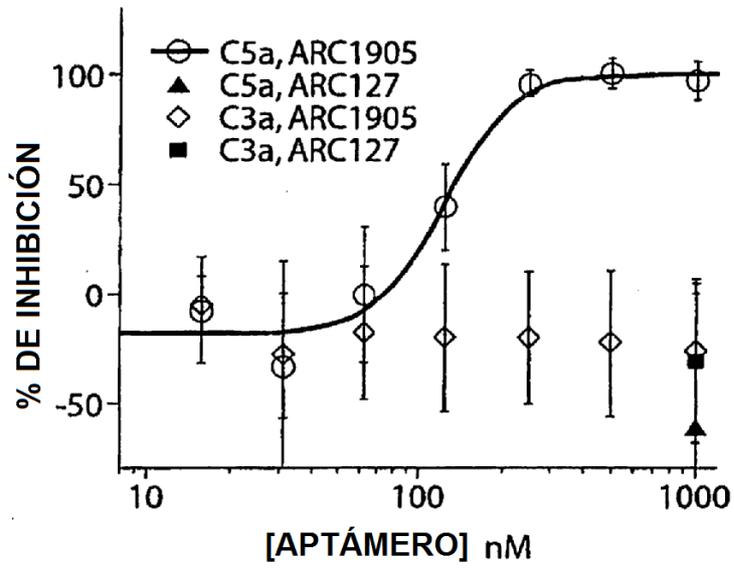


Fig. 67