

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 075**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2005** **E 13150168 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 2578683**

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

30 Prioridad:

12.02.2004 US 544542 P

25.02.2004 US 547747 P

21.06.2004 US 581685 P

07.09.2004 US 608048 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BENEDICT, CLAUDE;
DIENER, JOHN;
EPSTEIN, DAVID;
GRATE, DILARA;
KEENE, SARA CHESWORTH;
KURZ, JEFFREY;
KURZ, MARKUS;
MCCAULEY, THOMAS GREEN;
ROTTMAN, JAMES;
THOMPSON, KRISTIN;
WILSON, CHARLES y
ZOLTOSKI, ANNA J.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 531 075 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

Agentes terapéuticos de base aptámeros útiles en el tratamiento de trastornos relacionados con complemento

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere generalmente al campo de los ácidos nucleicos y más particularmente a aptámeros que pueden unirse a la proteína C5 del sistema de complemento, útiles como agentes terapéuticos y de diagnóstico en trastornos cardíacos, inflamatorios y autoinmunes relacionados con el complemento, lesión por reperfusión isquémica y/o otras enfermedades o trastornos en los que está implicada la activación del complemento mediada por C5. La invención se refiere además a materiales y a procedimientos para la administración de aptámeros que pueden unirse a la proteína del sistema del complemento C5.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que tienen afinidad de unión específica a moléculas a través de interacciones distintas del apareamiento de bases de Watson-Crick clásico.

[0003] Los aptámeros, al igual que los péptidos generados por expresión en fago o anticuerpos monoclonales ("mAbs"), pueden unirse específicamente a dianas seleccionadas y modular la actividad de la diana, por ejemplo, mediante la unión de aptámeros puede bloquearse el funcionamiento de la capacidad de su diana. Descubiertos por un procedimiento de selección *in vitro* de conjuntos de oligonucleótidos de secuencias al azar, se han generado aptámeros para más de 100 proteínas que incluyen factores de crecimiento, factores de transcripción, enzimas, inmunoglobulinas y receptores. Un aptámero típico tiene 10-15 kDa de tamaño (30-45 nucleótidos), se une a su diana con afinidad subnanomolar y discrimina a dianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, los aptámeros no se unirán normalmente a otras proteínas de la misma familia de genes). Una serie de estudios estructurales ha mostrado que los aptámeros pueden usar los mismos tipos de interacciones de unión (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, complementariedades electrostáticas, contactos hidrófobos, exclusión estérica) que accionan la afinidad y la especificidad en inmunocomplejos.

[0004] Los aptámeros tienen varias características deseables para su uso como agentes terapéuticos y de diagnóstico que incluyen alta especificidad y afinidad, eficacia biológica y excelentes propiedades farmacocinéticas. Además, ofrecen ventajas competitivas específicas con respecto a anticuerpos y otros agentes biológicos proteicos, por ejemplo:

1) Velocidad y control. Los aptámeros se producen por un procedimiento completamente *in vitro* que permite la rápida generación de cabezas de serie iniciales, que incluyen cabezas de serie terapéuticas. La selección *in vitro* permite que la especificidad y la afinidad del aptámero se controle exhaustivamente y permite la generación de cabezas de serie, incluyendo cabezas de serie contra dianas tanto tóxicas como no inmunogénicas.

2) Toxicidad e inmunogenicidad. Los aptámeros como clase han demostrado poca o ninguna toxicidad o inmunogenicidad. En una dosificación crónica de ratas o marmotas con altos niveles de aptámero (10 mg/kg al día durante 90 días) no se observó ninguna toxicidad por ninguna medida clínica, celular o bioquímica. Mientras que la eficacia de muchos anticuerpos monoclonales puede estar gravemente limitada por la respuesta inmunitaria a los propios anticuerpos, es extremadamente difícil provocar anticuerpos dirigidos contra aptámeros, lo más probablemente debido a que los aptámeros no pueden presentarse por linfocitos T mediante el MHC y la respuesta inmunitaria está generalmente entrenada para no reconocer fragmentos de ácido nucleico.

3) Administración. Mientras que la mayoría de los agentes terapéuticos de anticuerpos actualmente aprobados se administran por infusión intravenosa (normalmente durante 2-4 horas), los aptámeros pueden administrarse por inyección subcutánea (la biodisponibilidad del aptámero por administración subcutánea es >80% en estudios en mono (Tucker y col., J. Chromatography B. 732: 203-212, 1999)). Con buena solubilidad (>150 mg/ml) y peso molecular comparativamente bajo (aptámero: 10-50 kDa; anticuerpo: 150 kDa), una dosis semanal de aptámero puede administrarse por inyección en un volumen inferior a 0,5 ml. Además, el pequeño tamaño de los aptámeros permite que penetren en el área de limitaciones conformacionales que no permite que penetren anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, que presenta todavía otra ventaja de los agentes terapéuticos basados en aptámeros o profilaxis.

4) Escalabilidad y coste. Los aptámeros terapéuticos se sintetizan químicamente y por consiguiente pueden escalarse fácilmente según se necesite para cumplir la demanda de producción. Mientras que las dificultades en el escalado de la producción están limitando actualmente la disponibilidad de algunos agentes biológicos y el coste de 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 artículos para la síntesis de aptámeros a la escala de kilogramo se estima en 500 \$/g, comparable al de anticuerpos altamente optimizados. Se esperan mejoras continuas en el desarrollo de procedimientos para reducir el coste de los artículos a <100 \$/g en cinco años.

5) Estabilidad. Los aptámeros terapéuticos son químicamente consistentes. Están intrínsecamente adaptados para recuperar la actividad tras la exposición a factores tales como calor y desnaturalizantes y pueden almacenarse durante periodos prolongados (>1 año) a temperatura ambiente como polvos liofilizados.

El Sistema del Complemento

[0005] El sistema del complemento comprende un conjunto de al menos 20 proteínas del plasma y de membrana, que actúan juntas en un sistema de cascada regulado para atacar las formas extracelulares de los patógenos (por ejemplo, bacterias). El sistema del complemento incluye dos cascadas de activación enzimática distintas, las vías clásica y alternativa (figura 1), y una vía no enzimática conocida como la vía de ataque a membrana.

[0006] La primera cascada activada enzimáticamente, conocida como la vía clásica, comprende varios componentes, C1, C4, C2, C3 y C5 (enumerados por orden en la vía). El inicio de la vía clásica del sistema del complemento ocurre después de la unión y la activación del primer componente del complemento (C1) tanto mediante los activadores inmunes como los no inmunes. C1 comprende un complejo dependiente del calcio de los componentes C1q, C1r y C1s, y se activa a través de 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 superior globular, que está conectada a una cola similar al colágeno. La unión y activación de C1q por los inmunocomplejos tiene lugar a través de la región del grupo superior de C1q. Numerosos activadores de C1q que no son de anticuerpo, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, se unen a y activan C1q a través de un sitio distinto en la región del tallo similar al colágeno. Después, el complejo C1qrs cataliza la activación de los componentes del complemento C4 y C2, formando el complejo C4bC2a, que funciona como una convertasa de C3.

[0007] La segunda cascada activada enzimáticamente, conocida como la vía alternativa, es una ruta rápida, independiente del anticuerpo para la activación y amplificación del sistema del complemento. La vía alternativa comprende varios componentes, C3, Factor B y Factor D (enumerado por orden en la vía). La activación de la vía alternativa ocurre cuando C3b, una forma de escisión proteolítica de C3, se une a un agente superficial activador, tal como una bacteria. Entonces, el Factor B se une a C3b, y se escinde por el Factor D para producir la enzima activa, Ba. Después, la enzima Ba escinde más cantidad de C3 para generar más C3b, produciendo un extenso depósito de complejos C3b-Ba sobre la superficie activadora.

[0008] Así, tanto la vía clásica como la alternativa del complemento producen convertasas de C3 que dividen el factor C3 en C3a y C3b. En este punto, ambas convertasas de C3 se montan además en las convertasas de C5 (C4b2a3b y C3b3bBb). Estos complejos escinden posteriormente el componente C5 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 la proteína G 7 transmembrana, que se asoció originalmente con los leucocitos y ahora se sabe que se expresa en una variedad de tejidos, incluyendo los hepatocitos y las neuronas. La molécula de C5a es el componente quimiotáctico primario del sistema del complemento humano, y puede desencadenar una diversidad de respuestas biológicas, incluyendo la quimiotaxis del leucocito, contracción del músculo liso, activación de las vías de la transducción de señal intracelular, adhesión endotelial a neutrófilos, liberación del mediador de citocina y lípido y formación de oxidantes.

[0009] El fragmento C5b más grande se une secuencialmente a componentes posteriores de la cascada del complemento, C6, C7, C8 y C9 para formar el complejo de ataque a membrana C5b-9 ("MAC"). El MAC C5b-9 puede lisar directamente los eritrocitos, y en cantidades mayores, es lítico para los leucocitos y daña los tejidos, tales como las células musculares, epiteliales y endoteliales. En cantidades sublíticas, el MAC puede estimular la regulación por aumento de las moléculas de adhesión, el aumento del calcio intracelular y la liberación de citocina. Además, el MAC C5b-9 puede estimular células tales como las células endoteliales y las plaquetas sin causar la lisis celular. Los efectos no líticos de C5a y el MAC C5b-9 son algunas veces bastante similares.

[0010] Aunque el sistema del complemento tiene una función importante en el mantenimiento de la salud, tiene el potencial de provocar o contribuir a la enfermedad. Por ejemplo, el sistema del complemento se ha implicado en los efectos secundarios relacionados con la cirugía de revascularización coronaria ("CABG"), numerosas enfermedades y/o afecciones renales, reumatológicas, neurológicas, dermatológicas, hematológicas, vasculares/pulmonares, alérgicas, infecciosas y de biocompatibilidad/shock, 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.

[0011] En Fitch y col., Circ. 100: 2499-506 (1999), se probaron los efectos del fragmento de anticuerpo monocatenario anti-C5 Pexelizumab en pacientes que se someten a una cirugía de revascularización coronaria con bypass cardiopulmonar ("BCP"). A pacientes individuales se les administró Pexelizumab en una dosis de un solo bolo de 10 minutos justo antes del BCP a 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg y 2,0 mg/kg. Se extrajeron muestras de sangre y se ensayaron para observar la actividad del complemento antes de la dosis, 5 minutos después de la dosis, después de 5 min a 28 °C, después del inicio del recalentamiento, después de 5 min a 37 °C, y hasta 7 días después del BCP. El análisis farmacodinámico demostró una inhibición dependiente de la dosis significativa de la actividad hemolítica del complemento durante hasta 14 horas a una dosis de 2 mg/kg, y la generación de subproductos proinflamatorios del complemento (sC5b-9) se inhibió de forma eficaz de una forma dependiente de la dosis. Sin embargo, como se ha mencionado previamente, los agentes terapéuticos de anticuerpos tienen ciertas limitaciones.

[0012] Por consiguiente, será beneficioso tener inhibidores novedosos del sistema del complemento para su uso

agentes terapéuticos y de diagnóstico en el tratamiento de trastornos relacionados con el complemento.

[0013] El documento WO 99/41271 A1 describe métodos para identificar y preparar ligando de ácido nucleico de alta afinidad para las proteínas del sistema del complemento C1q, C3 y C5, incluyendo ligandos de ARN 5 identificados mediante el método SELEX.

[0014] Watson et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 10: 63-75 (2000) describe características de unión *in vitro*, parámetros farmacocinéticos y la inhibición del tráfico de linfocitos en un modelo de linfocito de ratón/humano de SCID para aptámeros de L-selectina antihumanos de ARN y ADNss de 2'F pirimidina 2'OH purina.

10

[0015] Bell et al., *In Vitro Cellular & Development Biology – Animal* 35: 533-542 (1999) describe la caracterización del aptámero específico de VEGF resistente a nucleasa NX1838 (oligonucleótido de base 2'-fluoropirimidina ARN/40 kDa PEG).

15 **[0016]** Vorobjev et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 10: 63-75 (2000) describe propiedades de oligodesoxinucleótidos quiméricos fabricados a partir de secuencias cortas (tetrameros, pentámeros, octámeros y decámeros) puenteados mediante enlazadores de hexametilendiol y hexaetilenglicol.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20

[0017] La figura 1 es una ilustración que representa las vías clásica y alternativa del sistema del complemento.

La figura 2 es una representación esquemática del procedimiento de selección de aptámeros *in vitro* (SELEX™) a partir de conjuntos de oligonucleótidos de secuencias al azar.

La figura 3A es una ilustración que representa la secuencia nucleotídica y la estructura secundaria de un aptámero anti-C5 (SEQ ID NO: 1), en la que los residuos subrayados son residuos de 2'-H pirimidina o residuos de 2'-fluoro pirimidina, los residuos en recuadros son residuos de 2'-fluoro pirimidina o residuos de 2'-OMe pirimidina, y los 25 residuos indicados por una flecha (→), representan residuos que deben contener una modificación con 2'-fluoro.

La figura 3B es una ilustración que representa la secuencia nucleotídica y la estructura secundaria del aptámero anti-C5 ARC330 (SEQ ID NO: 2), en la que los residuos en un círculo son residuos de 2'-H, los residuos de pirimidina están sustituidos con 2'-fluoro, y la mayoría de los residuos de purina están sustituidos con 2'-OMe, 30 excepto por los tres residuos de 2'-OH purina mostrados en contorno.

La figura 3C es una ilustración que representa la secuencia nucleotídica y la estructura secundaria del aptámero anti-C5 ARC186 (SEQ ID NO: 4), en la que todos los 21 residuos de pirimidina tienen modificaciones de 2'-fluoro y la mayoría de las purinas (14 residuos) tienen modificaciones de 2'-OMe, excepto por los tres residuos de 2'-OH purina 35 mostrados en contorno.

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

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

La figura 6 es una ilustración que representa diversas estrategias para la síntesis de conjugados de PEG-ácido 40 nucleico de alto peso molecular.

La figura 7A es una gráfica que compara la inhibición dependiente de la dosis de la hemólisis mediante los aptámeros anti-C5 PEGilados (ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62), y ARC187 (SEQ ID NO: 5)), a un aptámero anti-C5 no PEGilado (ARC186 (SEQ ID NO: 4)); la figura 7B es una tabla de los valores de Cl_{50} de los aptámeros utilizados en el ensayo de hemólisis representado en la figura 7A; la figura 7C es una gráfica que 45 compara la inhibición dependiente de la dosis de la hemólisis por los aptámeros anti-C5 PEGilados ARC187 (SEQ ID NO: 5), ARC1537 (SEQ ID NO: 65), ARC1730 (SEQ ID NO: 66), y ARC1905 (SEQ ID NO: 67); la figura 7D es una tabla de los valores de Cl_{50} de los aptámeros utilizados en el ensayo de hemólisis representado en la figura 7C.

La figura 8 es una gráfica del porcentaje de inhibición de la hemólisis por el aptámero anti-C5, ARC658 (SEQ ID NO: 62), del complemento de suero de macaco cynomolgus frente al complemento de suero humano.

La figura 9 es una gráfica que representa la unión de ARC186 (SEQ ID NO: 4) a la proteína C5 purificada tanto a 37 °C y a temperatura ambiente (23 °C) después de una incubación de 15 minutos.

La figura 10 es otra gráfica que representa la unión de ARC186 (SEQ ID NO: 4) a la proteína C5 purificada tanto a 37 °C y a temperatura ambiente (23 °C), después de una incubación de 4 horas.

La figura 11 es una gráfica que muestra el curso cronológico de la disociación del complejo C5·ARC186 a 23 °C.

La figura 12 es una gráfica que muestra el curso cronológico del equilibrio en la formación del complejo C5·ARC186 a 23 °C.

La figura 13 es una gráfica que representa ARC186 (SEQ ID NO: 4), que se une a la proteína C5 frente a los componentes de la proteína corriente arriba y corriente abajo en la cascada del complemento.

La figura 14 es una gráfica que representa el porcentaje de ARC186 radiomarcado (SEQ ID NO: 4) que se une a C5 en la presencia un competidor no marcado ARC186 (SEQ ID NO: 4), ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) o ARC187 (SEQ ID NO: 5).

La figura 15 es una gráfica que representa la cantidad de la proteína del complemento 5Sb producida en muestras de sangre incubadas durante 5 horas a 25 °C y 37 °C en presencia de concentraciones variables del aptámero ARC186 (SEQ ID NO: 4).

La figura 16 es una gráfica que representa el porcentaje de la inhibición del complemento por ARC187 (SEQ ID NO: 5) en presencia de zymosan en suero humano no diluido, sangre completa humana citrada o suero de mono

cynomolgus.

La figura 17 es una gráfica que muestra que ARC658 (SEQ ID NO: 62) inhibe completamente la activación del complemento (C5a) en el modelo de bucle de tubos descrito en el Ejemplo 1D.

La figura 18 es una gráfica que representa las constantes de disociación para la Ronda 10 de los conjuntos de selección de C5. Las constantes de disociación (K_d) se calcularon ajustando los datos a la ecuación: fracción de ARN unido = $\text{amplitud} \cdot K_d / (K_d + [C5])$. "ARC520" (SEQ ID NO: 70), se refiere a la agrupación dRmY no seleccionada sin tratar y "+" indica la presencia del competidor (0,1 mg/ml de ARNt, 0,1 mg/ml de ADN de esperma de salmón).

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

La figura 20 es una gráfica que representa una curva de CI_{50} que ilustra el efecto inhibitor en la actividad de la hemólisis de concentraciones variables del clon del aptámero anti-C5 ARC913 (SEQ ID NO: 75) en comparación con ARC186 (SEQ ID NO: 4).

La figura 21 es una ilustración que representa la estructura de ARC187 (SEQ ID NO: 5).

La figura 22 es una ilustración que representa la estructura de ARC1905 (SEQ ID NO: 67).

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

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

La figura 25 es una gráfica que compara los trazos de la presión para la presión intraventricular en el ventrículo izquierdo (LV) de los corazones aislados expuestos a las soluciones de aptámero/C5 10 x y 50 x equivalentes molares (donde se asume una concentración de aproximadamente 500 nM supone para C5 en el plasma humano normal no diluido).

La figura 26 es una gráfica que compara los cambios de la frecuencia cardiaca en latidos por minuto (lpm) en corazones de ratón aislados después de la exposición al plasma humano y diversas soluciones de plasma/aptámero.

La figura 27 es una gráfica que compara los cambios en el peso del corazón en corazones de ratón aislados antes y después de la exposición al plasma humano, que contiene una relación molar 0-1 x de ARC186 (SEQ ID NO: 4) (corazones que fallan), o una relación molar de 10-50 x (corazones protegidos con el aptámero C5).

La figura 28 es una gráfica que compara la producción relativa de C5a en el plasma humano, que contiene concentraciones variables de aptámero, después de la perfusión a través de los corazones de ratón aislados. Las concentraciones relativas de C5a se representan en forma de gráfica como unidades de absorbancia (Abs), donde las lecturas más altas reflejan la presencia de niveles más altos de C5a.

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

La figura 30 es una gráfica que muestra el efecto de ARC186 (SEQ ID NO: 4) en la escisión de C3 en el efluente de corazón de ratón.

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

La figura 32 es una tabla que muestra la relación molar de ARC658 (SEQ ID NO: 62) necesaria en suero humano o de primate, para proteger el corazón del daño mediado por C5b.

La figura 33 es una gráfica que muestra una gráfica logarítmica-lineal del porcentaje restante de ARC186 de longitud completa, como una función del tiempo de incubación en plasma de rata y de macaco cynomolgus.

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 media en plasma de ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) o ARC187 (SEQ ID NO: 5) frente al tiempo en ratas Sprague-Dawley.

La figura 36 es una gráfica que representa la concentración media en plasma de ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) y ARC187 (SEQ ID NO: 5) con el tiempo, después de la administración intravenosa del aptámero en ratas.

La figura 37 es una tabla que muestra el análisis no compartimentado de los datos de la concentración frente al tiempo representado en las figuras 35 y 36.

La figura 38A es una tabla que muestra el diseño para el estudio farmacocinético de ARC187 (SEQ ID NO: 5) y ARC1905 (SEQ ID NO: 67) en ratones; la figura 38B es una gráfica que representa el perfil farmacocinético de ARC187 (SEQ ID NO: 5) y ARC1905 (SEQ ID NO: 67) en ratones CD-1 después de la administración de un solo bolo IV; la figura 38C es una tabla que muestra el análisis no compartimentado de los datos de la concentración frente al tiempo representados en la figura 38B.

La figura 39 es una tabla que muestra la detección de los aptámeros enumerados en el tejido de corazón de ratón después de la administración intravenosa.

La figura 40 es una tabla que muestra el diseño experimental del Estudio 1 en animales, descrito en el Ejemplo 5E.

La figura 41 es una tabla que muestra la concentración en plasma del aptámero frente al tiempo después de la administración de un bolo intravenoso de aptámero a macacos cynomolgus.

La figura 42 es una tabla que enumera los parámetros farmacocinéticos para ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) y ARC187 (SEQ ID NO: 5), administrados por vía intravenosa a macacos cynomolgus en el Estudio 1.

Las figuras 43(a) y 43 (c) son gráficas que representan las concentraciones en plasma de sC5b-9 y C5a con el tiempo después de la administración intravenosa de los aptámeros anti-C5 ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62), o ARC187 (SEQ ID NO: 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 la concentración de los aptámeros anti-C5, ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62), o ARC187 (SEQ ID NO: 5).

La figura 44 es una tabla que muestra el diseño experimental del Estudio 2, descrito en el Ejemplo 5F.

La figura 45 es una gráfica que muestra la concentración media en plasma del aptámero a varios puntos de medición después de la administración intravenosa de ARC658 (SEQ ID NO: 62), o ARC187 (SEQ ID NO: 5) a macacos cynomolgus.

La figura 46 es una tabla que muestra dos análisis compartimentados de los datos de la concentración frente al tiempo después de la administración intravenosa de un bolo de aptámero a macacos cynomolgus.

La figura 47 es una gráfica que representa la concentración de C5b-9 frente a la concentración de ARC187 (SEQ ID NO: 5) o ARC658 (SEQ ID NO: 62) en presencia de zymosan en plasma de macaco cynomolgus.

La figura 48 es una gráfica que representa la concentración de C5a frente a la concentración de ARC187 (SEQ ID NO: 5) o ARC658 (SEQ ID NO: 62) en presencia de zymosan en plasma de macaco cynomolgus.

La figura 49 es una tabla que resume el estudio de PK-PD de ARC187 (SEQ ID NO: 5) durante y después de la administración de un bolo IV más infusión a macacos cynomolgus.

La figura 50 es una tabla que resume los parámetros farmacocinéticos para ARC187 (SEQ ID NO: 5) en macacos cynomolgus después de la administración de un bolo IV.

La figura 51 es una gráfica que representa los perfiles farmacocinéticos calculados y medidos realmente de ARC187 (SEQ ID NO: 5) durante y después de la administración de un bolo IV más infusión a macacos cynomolgus.

La figura 52 es una gráfica que muestra que los niveles en plasma de ARC187 activo (SEQ ID NO: 5) que permanecen constantes durante y después de la administración de un bolo IV más infusión a macacos cynomolgus.

La figura 53 es una tabla que muestra los requisitos de dosificación humanos predichos para los aptámeros anti-C5 en la cirugía CABG.

La figura 54 es una gráfica que representa que ARC187 (SEQ ID NO: 5) relativamente no tiene efecto *in vitro* en la coagulación como se mide por el tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT).

La figura 55 es una tabla que resume los efectos *in vitro* de ARC187 (SEQ ID NO: 5) en la actividad de anticoagulación de la heparina, y la actividad procoagulación de la protamina.

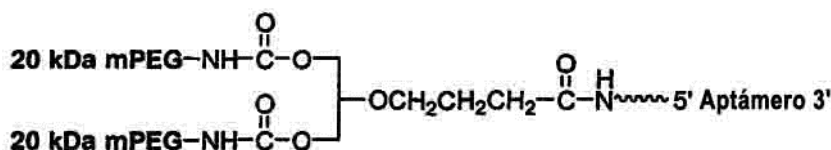
La figura 56 es una gráfica que muestra que ARC187 (SEQ ID NO: 5) no afecta la inversión de la anticoagulación de heparina *in vivo*.

La figura 57 es una gráfica que muestra que la heparina y la protamina no tienen efecto en la función anti-complemento de ARC187 (SEQ ID NO: 5), medida por la inhibición de la activación del complemento de zymosan.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0018] La presente invención proporciona materiales y procedimientos para el tratamiento, prevención y mejora de una enfermedad relacionada con el complemento. En una realización, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con ARC186 (SEQ ID NO: 4) que tiene PEG conjugado a su extremo 5'. En realizaciones particulares, este conjugado de aptámero ARC186/PEG comprende sustancialmente la misma afinidad de unión para la proteína del complemento C5 como un aptámero que comprende la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 4. Sustancialmente la misma afinidad de unión, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una diferencia de no más de aproximadamente 2 a diez veces, preferiblemente, una diferencia de no más de 2 a cinco veces en las constantes de disociación medidas mediante el análisis por transferencia "dot blot". En algunas realizaciones, las constantes de disociación se miden mediante análisis de transferencia "dot blot" por competición, tal como se describe en el Ejemplo 1A a continuación. En algunas realizaciones, el conjugado de aptámero/PEG comprende una semivida, preferiblemente la semivida terminal en un modelo de dos compartimentos, de al menos 15 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas en primates. En algunas realizaciones, el conjugado de aptámero/PEG comprende una semivida, preferiblemente la semivida terminal en un modelo de dos compartimentos, de al menos 10, preferiblemente al menos 15 horas en ratas. El conjugado de PEG para el extremo 5' de ARC186 (SEQ ID NO: 4), es un PEG de 40 kDa. El PEG de 40 kDa puede ser un PEG ramificado. El PEG de 40 kDa ramificado puede ser 1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida) o 2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo.

[0019] Cuando 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:



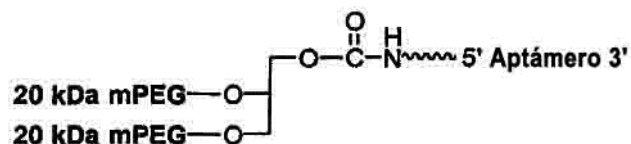
en el que

"" indica un enlazador

Aptámero = fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO: 4),

en el que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, y mG y mA = nucleótidos 2'-OMe y todos los demás nucleótidos son 2'-OH.

[0020] Cuando el PEG de 40 kDa ramificado es 2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo, se proporciona un aptámero que tiene la estructura expuesta a continuación:



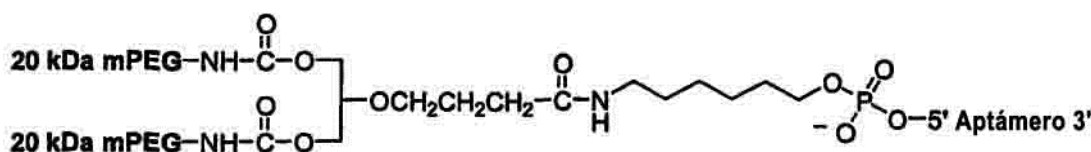
en el que
 "" indica un enlazador

Aptámero = fCmGfCfCGfCmGmGfUfCaJfCmAmGmGfCGfCfUmGrnAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO 4),

en el que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, y mG y mA = nucleótidos 2'-OMe y todos los demás nucleótidos son 2'-OH.

[0021] En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador alquilo. En realizaciones particulares, el enlazador alquilo comprende de 2 a 18 grupos CH₂ consecutivos. En realizaciones preferidas, el enlazador alquilo comprende de 2 a 12 grupos CH₂ consecutivos. En realizaciones particularmente preferidas, el enlazador alquilo comprende de 3 a 6 grupos CH₂ consecutivos.

[0022] Se describe un aptámero, ARC187 (SEQ ID NO: 5), que tiene la estructura expuesta a continuación:

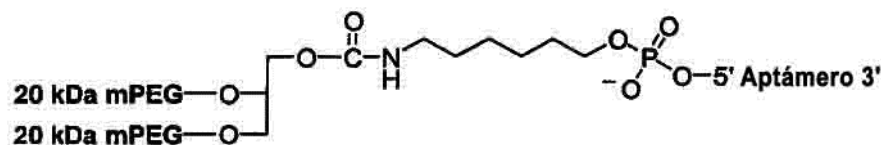


en el que **Aptámero** =

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCaJfCmAmGmGfCGfCfUmGrnAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO 4),

en el que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, y mG y mA = nucleótidos 2'-OMe y todos los demás nucleótidos son 2'-OH.

[0023] Se proporciona también un aptámero, ARC1905 (SEQ ID NO: 67), que tiene la estructura expuesta a continuación:



en el que **Aptámero** =

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCaJfCmAmGmGfCGfCfUmGrnAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO 4),

en el que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, y mG y mA = nucleótidos 2'-OMe y todos los demás nucleótidos son 2'-OH.

[0024] En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas. Se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ARC187 (SEQ ID NO: 5) o ARC1905 (SEQ ID NO: 67) o una sal de los mismos. La composición farmacéutica de la invención puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En este aspecto, se proporciona una composición farmacéutica de ARC187 (SEQ ID NO: 5) o ARC1905 (SEQ ID NO: 67) para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad *in vivo*.

[0025] En otro aspecto de la presente memoria, se proporcionan procedimientos de tratamiento. En una realización, el procedimiento comprende tratar, prevenir o mejorar una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, y/o sus derivados C5a y C5b-9, incluyendo el procedimiento administrar una composición farmacéutica que comprende ARC187 (SEQ ID NO: 5) o ARC1905 (SEQ ID NO: 67) o una sal de los mismos, a un vertebrado. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar la composición farmacéutica de la invención a un mamífero. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

[0026] En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se va a tratar, es una enfermedad isquémica aguda (infarto de miocardio, ictus, lesión isquémica/reperfusión);

enfermedades inflamatorias agudas (enfermedad infecciosa, septicemia, shock, rechazo a trasplante 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, soriasis y otras enfermedades dermatológicas, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico (LES), rechazo a trasplante subagudo/crónico, glomerulonefritis y otras enfermedades renales). En algunas realizaciones, las enfermedades mediadas por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se van a tratar incluyen la activación del complemento asociada con diálisis o circunstancias en las que la sangre pasa sobre y/o a través de un entubado sintético y/o material extraño. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se va a tratar, se selecciona entre grupo que consiste en lesión de miocardio relacionada con cirugía CABG, lesión de miocardio relacionada con angioplastia con globo y lesión de miocardio relacionada con restenosis. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se va a tratar son complicaciones relacionadas con la cirugía CABG. En una realización particular, la enfermedad que se va a tratar es una lesión de miocardio relacionada con la cirugía CABG.

[0027] En algunas realizaciones, el procedimiento de la presente memoria incluye administrar la composición farmacéutica que comprende ARC187 (SEQ ID NO: 5) o ARC1905 (SEQ ID NO: 67), para conseguir una concentración de aptámero en plasma que sea de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 veces la de la proteína del complemento C5 endógena. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas del aptámero ARC187 (SEQ ID NO: 5) o ARC1905 (SEQ ID NO: 67), se administran para conseguir una concentración de aptámero en plasma que sea 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 ARC187 (SEQ ID NO: 5) o ARC1905 (SEQ ID NO: 67), se administra para conseguir una concentración de aptámero en plasma 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.

[0028] Puede usarse cualquier combinación de ruta, duración y velocidad de administración que sea suficiente para conseguir las concentraciones de aptámero en plasma. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra como un bolo y/o por infusión continua.

[0029] En las realizaciones particulares para tratar, prevenir y/o mejorar las complicaciones relacionadas con la cirugía CABG, particularmente una lesión de miocardio relacionada con la cirugía CABG, el procedimiento de la presente memoria 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, se consigue una concentración de aptámero en plasma de aproximadamente dos veces la concentración de la proteína del complemento endógena mediante la administración de un bolo intravenoso de aproximadamente 0,75 a 1,25, preferiblemente de aproximadamente 1 mg de aptámero por kg del paciente que se va a tratar antes de, simultáneamente con o después de la infusión intravenosa de una dosis más baja de aptámero, donde mg no incluye el peso del PEG conjugado. En algunas realizaciones, la dosis más baja se infundirá a una velocidad seleccionada entre el intervalo de 0,001 a 0,005 mg/kg/minuto, en el que mg no incluye el peso del PEG conjugado. En una realización particular, la dosis más baja se infundirá a una velocidad de aproximadamente 0,0013 mg/kg/minuto. En aún otras realizaciones, cuando el aptámero/conjugado comprende una semividua suficientemente larga, la composición farmacéutica del aptámero puede administrarse una o dos veces al día en forma de una dosis de un bolo intravenoso.

[0030] En otro aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos de diagnóstico. Se describe un procedimiento de diagnóstico que comprende poner en contacto ARC187 (SEQ ID NO: 5) o ARC1905 (SEQ ID NO: 67) 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. En algunas realizaciones, la proteína del complemento o la variante es de vertebrado, particularmente de mamífero, y más particularmente humana. Se describe una composición de ARC187 (SEQ ID NO: 5) o ARC1905 (SEQ ID NO: 67) para su uso para el diagnóstico *in vitro* o *in vivo*.

[0031] La presente memoria proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: ARC330 (SEQ ID NO: 2) y ARC188-189, ARC250, ARC296-297, ARC331-334, ARC411-440, ARC457-459, ARC473, ARC522-525, ARC532, ARC543-544, ARC550-554, ARC657-658, ARC672, ARC706, ARC1537, ARC1730 (SEQ ID NOS: 6 a SEQ NO: 66). En una realización particular, un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. En una realización particular, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, y la SEQ ID NO: 64 a la SEQ ID NO: 66. En algunas realizaciones, cuando el aptámero comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, y la SEQ ID NO: 64 a la SEQ ID NO: 66, el aptámero comprende sustancialmente la misma afinidad de unión para la proteína del complemento C5 que un aptámero que comprende la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 4.

[0032] En algunas realizaciones, cuando el aptámero comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, y la SEQ ID NO: 64 a la SEQ ID NO: 66, el aptámero comprende una semivida, preferiblemente la semivida terminal en un modelo de dos compartimientos, de al menos 15, preferiblemente al menos 30 horas en primates. En algunas realizaciones, cuando el aptámero comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, y la SEQ ID NO: 64 a la SEQ ID NO: 66, el aptámero comprende una semivida, preferiblemente la semivida terminal en un modelo de dos compartimientos, de al menos 1 y media, preferiblemente al menos siete horas en ratas.

- 10 **[0033]** En algunas realizaciones de este aspecto de la presente memoria, cuando el aptámero comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, y la SEQ ID NO: 64 a la SEQ ID NO: 66, el aptámero se sintetiza con un enlazador 5' tal como se indica a continuación:

H_2N ~~~~~ 5' Aptámero 3',

- 15 en el que "~~~~" representa el enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador de alquilo tal como se indica a continuación: $H_2N-(CH_2)_n-5'$ **Aptámero** 3', en el que $n = 2$ a 18, preferiblemente $n = 2-12$, más preferiblemente $n = 3$ a 6, más preferiblemente $n = 6$, y en el que **Aptámero** =

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCaJfCmAmGmGfCGfCfUmGrnAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUfCfCfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO 4),

- 20 en el que fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, y mG y mA = nucleótidos 2'-OMe y todos los demás nucleótidos son 2'-OH. El aptámero modificado con amina resultante puede conjugarse con un resto de PEG seleccionado del grupo que consiste en un PEG lineal de 10 kDa, PEG de 20 kDa, PEG de 30 kDa y PEG de 40 kDa. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6 a SEQ NO: 66, particularmente del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, y la SEQ ID NO: 64 a la SEQ ID NO: 66 o una sal de la misma. La composición farmacéutica de la presente memoria puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En este aspecto, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad *in vivo*, que
- 25 comprende un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6 a SEQ NO: 66, particularmente del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, y la SEQ ID NO: 64 a la SEQ ID NO: 66.

- [0034]** En otra realización, se proporciona un procedimiento para tratar, prevenir o mejorar 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 el aptámero comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6 a SEQ NO: 66, particularmente del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, y la SEQ ID NO: 64 a SEQ ID NO: 66 a un vertebrado. En algunas realizaciones de este aspecto de la presente memoria, el procedimiento comprende administrar la
- 35 composición farmacéutica de la presente memoria a un mamífero, preferiblemente un ser humano.

- [0035]** En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se va a tratar, es una enfermedad isquémica aguda (infarto de miocardio, ictus, lesión isquémica/reperfusión); enfermedades inflamatorias agudas (enfermedad infecciosa, septicemia, shock, rechazo a trasplante 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, soriasis y otras enfermedades dermatológicas, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico (LES), rechazo a trasplante subagudo/crónico, glomerulonefritis y otras enfermedades renales). En algunas realizaciones, las enfermedades mediadas por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se van a tratar incluyen la
- 45 activación del complemento asociada con diálisis o circunstancias en las que la sangre pasa sobre y/o a través de un entubado sintético y/o material extraño. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se va a tratar, se selecciona entre grupo que consiste en lesión de miocardio relacionada con cirugía CABG, lesión de miocardio relacionada con angioplastia con globo y lesión de miocardio relacionada con restenosis. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se va a tratar son complicaciones relacionadas con la cirugía CABG. En una realización particular, la enfermedad que se va a tratar es una lesión de miocardio relacionada con cirugía CABG.
- 50
- 55

- [0036]** En algunas realizaciones, el procedimiento de la presente memoria incluye administrar la composición farmacéutica que comprende un aptámero que tiene una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 6 a la SEQ NO: 66, particularmente del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, y la SEQ ID NO: 64 a la SEQ ID NO: 66, a un paciente 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, las composiciones farmacéuticas del aptámero se administran para conseguir una concentración de aptámero en plasma que es aproximadamente 0,75 a
- 60 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
- 65

administra para conseguir una concentración equivalente a la de la proteína del complemento endógena. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente memoria 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.

[0037] Puede usarse cualquier combinación de ruta, duración y velocidad de administración que sea suficiente para conseguir las concentraciones del aptámero en plasma de la presente memoria. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra como un bolo y/o por infusión continua.

[0038] En realizaciones particulares para tratar, prevenir y/o mejorar las complicaciones relacionadas con la cirugía CABG, particularmente la lesión de miocardio relacionada con la cirugía CABG, el procedimiento de la presente memoria 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 presente memoria, la concentración del aptámero en plasma deseada, por ejemplo, dos veces la concentración de la proteína del complemento endógena en algunas realizaciones, se logra mediante la administración de un bolo intravenoso al paciente que se va a tratar antes de, simultáneamente con, o después de la infusión intravenosa de una dosis más baja de aptámero. En aún otras realizaciones de este aspecto de la presente memoria, cuando el aptámero/conjugado comprende una semivida suficientemente larga, la composición farmacéutica del aptámero puede administrarse una o dos veces al día como una dosis de un bolo intravenoso.

[0039] En otro aspecto de la memoria, se proporcionan procedimientos de diagnóstico. En una realización, el procedimiento de diagnóstico comprende poner en contacto una composición que se sospecha que comprende la proteína del complemento C5, o una variante de la misma, con un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 6 a la SEQ ID NO: 66, particularmente del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, y la SEQ ID NO: 64 a la SEQ ID NO: 66, y detectar la presencia o ausencia de la proteína del complemento C5 o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la proteína del complemento o la variante es de vertebrado, particularmente de mamífero, y más particularmente humana. La presente memoria proporciona una composición de aptámero que tiene un aptámero que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 6 a la SEQ ID NO: 66, para utilizar en el diagnóstico *in vitro* o *in vivo*.

[0040] En otro aspecto de la presente memoria, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica que es idéntica al 80% a una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en ARC915, ARC 874-878, ARC954, SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83, y SEQ ID NOS: 88 a 98. En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica que es idéntica al 80% a la región única de una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 75 a 81 y las SEQ ID NOS: 88 a 98. En otra realización, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica que es idéntica al 90% a una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83, y las SEQ ID NOS: 88 a 98. En una realización particular, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica que es idéntica al 90% a la región única de una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 75 a 81 y las SEQ ID NOS: 88 a 98. En aún otra realización, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica de 40 nucleótidos contiguos idénticos a 40 nucleótidos contiguos incluidos en una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 75 a 81 y las SEQ ID NOS: 88 a 98. En otra realización, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica de 30 nucleótidos contiguos idénticos a 30 nucleótidos contiguos incluidos en una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83 y las SEQ ID NOS: 88 a 98. En aún otra realización, se proporciona un aptámero que se une de manera específica a la proteína del complemento C5, que comprende una secuencia nucleotídica de 10 nucleótidos contiguos idénticos a 10 nucleótidos contiguos incluidos en una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83 y las SEQ ID NOS: 88 a 98. En una realización preferida, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con una cualquiera de las secuencias nucleotídicas seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NOS: 88 a 98.

[0041] En algunas realizaciones, los aptámeros de este aspecto de la presente memoria descritos inmediatamente antes pueden comprender adicionalmente una modificación química seleccionada del grupo que consiste en: una sustitución química en una posición del azúcar; una sustitución química en una posición de fosfato; y una sustitución química en una posición en una base de la secuencia de ácidos nucleico. En algunas realizaciones, la modificación se selecciona del grupo que consiste en: la incorporación de un nucleótido modificado; protección 3', conjugación con un compuesto no inmunogénico de alto peso molecular; conjugación con un compuesto lipófilo y modificación de la cadena principal de fosfato.

[0042] En realizaciones preferidas de este aspecto de la presente memoria, 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, preferiblemente *in vivo*, más preferiblemente *in vivo* en seres humanos. En una realización de este aspecto de la presente memoria, la función modulada, preferiblemente inhibida, por el aptámero es la escisión de la proteína del complemento C5.

- 5 **[0043]** 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 la proteína del complemento C5 *in vivo* o una sal de la misma, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- [0044]** Se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica idéntica al 80%, preferiblemente idéntica al 90%, a una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83 y las SEQ ID NOS: 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 nucleotídica idéntica al 80%, preferiblemente idéntica al 90% a la región única de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83 y las SEQ ID NOS: 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 ó 10 nucleótidos contiguos idénticos a 40, 30 ó 10 nucleótidos, respectivamente, de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83 y las SEQ ID NOS: 88 a 98. La composición farmacéutica puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se describe una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad *in vivo*, cuando la composición farmacéutica comprende un aptámero que tiene una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NOS: 3 a 4, SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83 y las SEQ ID NOS: 88 a 98 o una sal del mismo.

- 25 **[0045]** En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se va a tratar, es una enfermedad isquémica aguda (infarto de miocardio, ictus, lesión isquémica/reperfusión); enfermedades inflamatorias agudas (enfermedad infecciosa, septicemia, shock, rechazo a trasplante 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, soriasis y otras enfermedades dermatológicas, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico (LES), rechazo a trasplante subagudo/crónico, glomerulonefritis y otras enfermedades renales). En algunas realizaciones, las enfermedades mediadas por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se van a tratar incluyen la activación del complemento asociada con diálisis o circunstancias en las que la sangre pasa sobre y/o a través de un entubado sintético y/o material extraño. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se va a tratar, se selecciona entre grupo que consiste en lesión de miocardio relacionada con cirugía CABG, lesión de miocardio relacionada con angioplastia con globo y lesión de miocardio relacionada con restenosis. En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 que se va a tratar son complicaciones relacionadas con la cirugía CABG. En una realización particular, la enfermedad que se va a tratar es una lesión de miocardio relacionada con cirugía CABG.

- 40 **[0046]** En algunas realizaciones, el procedimiento de la presente memoria incluye administrar la composición farmacéutica que comprende un aptámero que tiene una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOS: 3 a 4, SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83 y las SEQ ID NOS: 88 a 98, a un paciente 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, las composiciones farmacéuticas del aptámero se administran 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 presente memoria se administra para conseguir una concentración de aptámero en plasma 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.

- [0047]** Puede usarse cualquier combinación de ruta, duración y velocidad de administración que sea suficiente para conseguir las concentraciones del aptámero en plasma de la presente memoria. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra como un bolo y/o por infusión continua.

- [0048]** En realizaciones particulares para tratar, prevenir y/o mejorar las complicaciones relacionadas con la cirugía CABG, particularmente la lesión de miocardio relacionada con la cirugía CABG, el procedimiento de la presente memoria 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 presente memoria, la concentración del aptámero en plasma deseada, por ejemplo, dos veces la concentración de la proteína del complemento endógena en algunas realizaciones, se logra mediante la administración de un bolo intravenoso al paciente que se va a tratar antes de, simultáneamente con o después de la infusión intravenosa de una dosis más baja de aptámero. En aún otras

realizaciones de este aspecto de la presente memoria, cuando el aptámero/conjugado comprende una semivida suficientemente larga, la composición farmacéutica del aptámero puede administrarse una o dos veces al día como una dosis de un bolo intravenoso.

- 5 **[0049]** En otra realización, se proporciona un procedimiento de diagnóstico, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una composición que se sospecha que comprende la proteína del complemento C5, o una variante de la misma, con un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83 y las SEQ ID NOS: 88 a 98, y detectar la presencia o ausencia de la proteína del complemento C5, o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la proteína del
10 complemento, o la variante, es de vertebrado, particularmente de mamífero, y más particularmente humana. La presente memoria proporciona una composición de aptámero que tiene un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NOS: 75 a 81, SEQ ID NO: 83 y las SEQ ID NOS: 88 a 98, para su uso para el diagnóstico *in vitro* o *in vivo*.
- 15 **[0050]** En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica que consiste esencialmente en una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 68 y 69. En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que comprende una secuencia nucleotídica que consiste en una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 68 y 69. En algunas realizaciones de este aspecto de la presente memoria, los aptámeros pueden usarse en un procedimiento de
20 diagnóstico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- [0051]** Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta a
25 continuación. Aunque en la práctica y ensayo de la presente invención puede usarse cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes en los descritos en el presente documento, ahora se describen los procedimientos preferidos y materiales. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción. En la memoria descriptiva, las formas singulares también incluyen el plural, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos
30 usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En el caso de conflicto, predominará la presente memoria descriptiva.

El Procedimiento SELEX™

- 35 **[0052]** Un procedimiento adecuado para generar un aptámero es con el procedimiento titulado "Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial" ("*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*") ("SELEX™") generalmente representado en la figura 2. El procedimiento SELEX™ es un procedimiento para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica a moléculas diana y se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands" y la
40 patente de Estados Unidos N° 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813) titulada "Nucleic Acid Ligands". 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 SELEX™ se basa en el único conocimiento de que los ácidos nucleicos tienen suficiente capacidad para formar una variedad de estructuras bi y tridimensionales y versatilidad química suficiente disponible dentro de sus monómeros para actuar como ligandos (es decir, forman
45 pares de unión específica) con prácticamente cualquier compuesto químico, tanto monomérico como polimérico. Las moléculas de cualquier tamaño o composición pueden servir de dianas.

- [0053]** SELEX™ se basa como punto de partida en un gran biblioteca o conjunto de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden secuencias al azar. Los oligonucleótidos pueden ser ADN, ARN, o híbridos de
50 ADN/ARN, modificados o sin modificar. En algunos ejemplos, el conjunto comprende el 100% de oligonucleótidos al azar o parcialmente al azar. En otros ejemplos, el conjunto comprende oligonucleótidos al azar o parcialmente al azar que contienen al menos una secuencia fija y/o secuencia conservada incorporada dentro de la secuencia al azar. En otros ejemplos, el conjunto comprende oligonucleótidos al azar o parcialmente al azar que contienen al menos una secuencia fija y/o conservada en su extremo 5' y/o 3' que puede comprender una secuencia compartida
55 por todas las moléculas del conjunto 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 tratos de poli A o poli T, núcleos catalíticos, sitios para la unión selectiva a columnas de afinidad, y otras secuencias para facilitar la clonación y/o secuenciación de un oligonucleótido de interés. Las secuencias conservadas son secuencias, distintas de las secuencias fijas que se han
60 descrito previamente, compartidas por varios aptámeros que se unen a la misma diana.

- [0054]** Los oligonucleótidos del conjunto incluyen preferiblemente una parte de secuencia al azar, así como secuencias fijas necesarias para una amplificación eficiente. Normalmente, los oligonucleótidos del conjunto de partida contienen secuencias de los extremos 5' y 3' fijas que flanquean una región interna de 30-50 nucleótidos al
65 azar. Los nucleótidos al azar pueden producirse de varias formas que incluyen síntesis química y selección de tamaño a partir de ácidos nucleicos celulares escindidos al azar. La variación de secuencias en ácidos nucleicos de

prueba también puede introducirse o aumentarse por mutagénesis antes de o durante las iteraciones de selección/amplificación.

[0055] La parte de secuencia al azar del oligonucleótido puede ser de cualquier longitud y puede comprender ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos y pueden incluir nucleótidos modificados o no naturales o análogos de nucleótidos. Véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.958.691; la patente de Estados Unidos Nº 5.660.985; la patente de Estados Unidos Nº 5.958.691; la patente de Estados Unidos Nº 5.698.687; la patente de Estados Unidos Nº 5.817.635; la patente de Estados Unidos Nº 5.672.695 y la publicación PCT WO 92/07065. Los oligonucleótidos al azar pueden sintetizarse a partir de nucleótidos ligados a fosfodiéster usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Froehler y col., Nucl. Acid Res. 14: 5399-5467 (1986) y Froehler y col., Tet. Lett. 27: 5575-5578 (1986). Los oligonucleótidos al azar también puede sintetizarse usando procedimientos de fase sólida, tales como los procedimientos de síntesis de triésteres. Véase, por ejemplo, Sood y col., Nucl. Acid Res. 4: 2557 (1977) y Hirose y col., Tet. Lett., 28: 2449 (1978). Las síntesis típicas realizadas en un equipo de síntesis de ADN automatizado dan 10^{14} - 10^{16} moléculas individuales, un número suficiente para la mayoría de los experimentos de SELEX™. Regiones suficientemente grandes de la secuencia al azar en el diseño de secuencias aumenta la probabilidad de que cada molécula sintetizada represente probablemente una única secuencia.

[0056] La biblioteca de partida de oligonucleótidos puede generarse por síntesis química automatizada en un sintetizador de ADN. Para sintetizar secuencias al azar, se añaden mezclas de cuatro nucleótidos a cada etapa de adición de nucleótidos durante el procedimiento de síntesis, permitiendo la incorporación al azar de los nucleótidos. Como se ha establecido anteriormente, en una realización, los oligonucleótidos al azar comprenden las secuencias al azar completas; sin embargo, en otras realizaciones, los oligonucleótidos al azar puede comprender extensiones de secuencias no al azar o parcialmente al azar. Las secuencias parcialmente al azar pueden crearse añadiendo los cuatro nucleótidos en diferentes relaciones molares en cada etapa de adición.

[0057] La biblioteca de partida de oligonucleótidos pueden ser tanto ARN como ADN. En aquellos casos en los que vaya a usarse una biblioteca de ARN como biblioteca de partida, normalmente se genera transcribiendo una biblioteca de ADN *in vitro* usando ARN polimerasa T7 o ARN polimerasas T7 modificadas y se purifica. Entonces, la biblioteca de ARN o ADN se mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión y se somete a iteraciones escalonadas de unión, separación y amplificación, usando el mismo esquema de selección general, para lograr prácticamente cualquier criterio deseado de afinidad y selectividad de unión. Más específicamente, empezando con una mezcla que contiene el conjunto de partida de ácidos nucleicos, el procedimiento SELEX™ incluye las etapas de: (a) poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión; (b) separar ácidos nucleicos sin unir de aquellos ácidos nucleicos que se han unido específicamente a moléculas diana; (c) disociar los complejos ácido nucleico-diana; (d) amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos ácido nucleico-diana para dar una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos; y (e) reiterar las etapas de unión, separación, disociación y amplificación a lo largo de tantos ciclos como se desee para dar ligandos de ácido nucleico altamente específicos de alta afinidad a la molécula diana. En aquellos casos en los que los aptámeros de ARN se estén seleccionando, el procedimiento SELEX™ comprende adicionalmente las etapas de: (i) transcribir de forma inversa los ácidos nucleicos disociados de los complejos ácido nucleico-diana antes de la amplificación en la etapa (d); y (ii) transcribir los ácidos nucleicos amplificados de la etapa (d) antes de volver a empezar el procedimiento.

[0058] Dentro de una mezcla de ácidos nucleicos que contiene un gran número de posibles secuencias y estructuras hay un amplio intervalo de afinidades de unión por una diana dada. Una mezcla de ácidos nucleicos que comprende, por ejemplo, un segmento de 20 nucleótidos al azar puede tener 4^{20} posibilidades de candidatos. Aquellas que tienen constantes de mayor afinidad para la diana son las que más probablemente se unan a la diana. Después de la separación, la disociación y la amplificación se genera una segunda mezcla de ácidos nucleicos, enriquecida para los candidatos de mayor afinidad de unión. Las rondas adicionales de selección favorecen progresivamente los mejores ligandos hasta que la mezcla de ácidos nucleicos resultante esté predominantemente compuesta por sólo una o algunas secuencias. Entonces, éstas puede clonarse, secuenciarse y probarse individualmente para la afinidad de unión en forma de ligandos o aptámeros puros.

[0059] Los ciclos de selección y amplificación se repiten hasta que se logra un objetivo deseado. En el caso más general, la selección/amplificación continúa hasta que no se logra mejora significativa en la fuerza de unión con la repetición del ciclo. El procedimiento se usa normalmente para muestrear aproximadamente 10^{14} especies de ácidos nucleicos diferentes, pero puede usarse para muestrear nada menos que aproximadamente 10^{18} especies de ácidos nucleicos diferentes. Generalmente, las moléculas de aptámero de ácido nucleico se seleccionan en un procedimiento de 5 a 20 ciclos. En una realización, la heterogeneidad sólo se introduce en las fases de selección iniciales y no se produce en todo el procedimiento de replicación.

[0060] En una realización de SELEX™, el procedimiento de selección es tan eficiente en el aislamiento de los ligandos de ácido nucleico que se unen más fuertemente a la diana seleccionada que sólo se requiere un ciclo de selección y amplificación. Tal selección eficiente puede producirse, por ejemplo, en un procedimiento de tipo cromatográfico en el que la capacidad de los ácidos nucleicos para asociarse con dianas unidas sobre una columna opera de tal forma que la columna puede permitir suficientemente la separación y aislamiento de los ligandos de

ácido nucleico de mayor afinidad.

[0061] En muchos casos no es necesariamente deseable realizar las etapas iterativas de SELEX™ hasta que se identifique un ligando de un único ácido nucleico. La solución de ligandos de ácido nucleico específicos para diana puede incluir una familia de estructuras de ácido nucleico o motivos que tienen varias secuencias conservadas y varias secuencias que pueden estar sustituidas o añadidas sin afectar significativamente la afinidad de los ligandos de ácido nucleico por la diana. Terminando el procedimiento SELEX™ antes de completarse es posible determinar la secuencia de varios miembros de la familia de la solución de ligandos de ácidos nucleico.

[0062] Se sabe que existe una diversidad de estructuras primarias, secundarias y terciarias de ácido nucleico. Las estructuras o motivos que se han mostrado que están más comúnmente implicadas en interacciones de tipo no Watson-Crick se denominan bucles en horquilla, protuberancias simétricas y asimétricas, pseudonudos y combinaciones de miríadas de los mismos. Casi todos los casos conocidos de tales motivos sugieren que pueden formarse en una secuencia de ácidos nucleicos de no más de 30 nucleótidos. Por este motivo, frecuentemente se prefiere que los procedimientos SELEX™ con segmentos al azar contiguos se inicien con secuencias de ácidos nucleicos que contienen un segmento al azar de entre aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos, y de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 nucleótidos en algunas realizaciones. En un ejemplo, la secuencia fija en 5':al azar:fija en 3' comprende una secuencia al azar de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 nucleótidos.

[0063] El procedimiento SELEX™ central se ha modificado para lograr varios objetivos específicos. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.707.796 describe el uso de SELEX™ conjuntamente con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas tales como ADN curvado. La patente de Estados Unidos Nº 5.763.177 describe procedimientos basados en SELEX™ para seleccionar ligandos de ácido nucleico que contienen grupos fotorreactivos que pueden unirse y/o fotorreticularse con y/o fotoinactivar una molécula diana. La patente de Estados Unidos Nº 5.567.588 y la patente de Estados Unidos Nº 5.861.254 describen procedimientos basados en SELEX™ que consiguen una separación altamente eficiente entre oligonucleótidos que tienen alta y baja afinidad por una molécula diana. La patente de Estados Unidos Nº 5.496.938 describe procedimientos para obtener ligandos de ácido nucleico mejorados después se realizase el procedimiento SELEX™. La patente de Estados Unidos Nº 5.705.337 describe procedimientos para ligar covalentemente un ligando a su diana.

[0064] SELEX™ también puede usarse para obtener ligandos de ácido nucleico que se unen a más de un sitio en la molécula diana, y para obtener ligandos de ácido nucleico que incluyen especies de no ácido nucleico que se unen a sitios específicos en la diana. SELEX™ proporciona medios para aislar e identificar ligandos de ácido nucleico que se unen a cualquier diana prevista, incluyendo, biomoléculas grandes y pequeñas, tales como proteínas de unión a ácido nucleico y proteínas que no se unen a ácidos nucleicos como parte de su función biológica, así como cofactores y otras moléculas pequeñas. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.580.737 desvela secuencias de ácidos nucleicos identificadas por SELEX™ que pueden unirse con alta afinidad a cafeína y al análogo estrechamente relacionado, la teofilina.

[0065] Counter-SELEX™ es un procedimiento para mejorar la especificidad de ligandos de ácido nucleico por una molécula diana eliminando secuencias de ligando de ácido nucleico con reactividad cruzada por una o más moléculas no diana. Counter-SELEX™ comprende las etapas de: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen una afinidad elevada por la diana con respecto a la mezcla candidata pueden separarse del resto de la mezcla candidata; (c) separar los ácidos nucleicos con elevada afinidad del resto de la mezcla candidata; (d) disociar los ácidos nucleicos con elevada afinidad de la diana; (e) poner en contacto los ácidos nucleicos con elevada afinidad con una o más moléculas no diana de forma que se eliminen los ligandos de ácido nucleico con especificidad específica por la(s) molécula(s) no diana; y (f) amplificar los ácidos nucleicos con especificidad específica sólo por la molécula diana para dar una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácidos nucleicos con una afinidad y especificidad relativamente mayor por la unión a la molécula diana. Como se ha descrito anteriormente para SELEX™, los ciclos de selección y amplificación se repiten según sea necesario hasta que se logre un objetivo deseado.

[0066] Un posible problema encontrado en el uso de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos y vacunas es que los oligonucleótidos en su forma de fosfodiéster pueden degradarse rápidamente en fluidos corporales por enzimas intracelulares y extracelulares, tales como endonucleasas y exonucleasas antes de manifestarse el efecto deseado. Por tanto, el procedimiento SELEX™ incluye 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 administración mejoradas. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de ribosa y/o fosfato y/o base. Se describen ligandos de ácido nucleico identificados por SELEX™ que contienen nucleótidos modificados, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 5.660.985, que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos químicamente modificados en la posición 2' de ribosa, posición 5 de pirimidinas y posición 8 de purinas, la patente de Estados Unidos Nº 5.756.703 que describe oligonucleótidos que contienen diversas pirimidinas modificadas en 2', y la patente de Estados Unidos

Nº 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'-flúor (2'-F) y/o 2'-OMe.

[0067] Las modificaciones de los ligandos de ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, las que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, hidrofobia, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y fluxionalidad con las bases de los ligandos de ácido nucleico o con el ligando de ácido nucleico como un conjunto. Las modificaciones para generar poblaciones de oligonucleótidos que son 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 en el azúcar en la posición 2', modificaciones en la pirimidina en la posición 5, modificaciones en la purina en la posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo, modificaciones en la estructura principal, modificaciones en fosforotioato o fosfato de alquilo, metilaciones, y combinaciones de apareamientos de bases inusuales, tales como las isobases isocitidina e isoguanidina. Las modificaciones también puede incluir modificaciones en 3' y 5', tales como protección.

[0068] En una realización se proporcionan oligonucleótidos en los que el grupo P(O)O está sustituido 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 las que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o sin sustituir. Los grupos de enlace pueden unirse a nucleótidos adyacentes a través de un enlace -O-, -N- o -S-. No se requiere que todos los enlaces en el oligonucleótido sean idénticos. Como se usa en el presente documento, el término fosforotioato incluye uno o más átomos de oxígeno que no forman puentes en un enlace fosfodiéster sustituido con uno o más átomos de azufre.

[0069] En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos comprenden grupos azúcar modificados, por ejemplo, uno o más de los grupos hidroxilo se reemplaza por halógeno, grupos alifáticos, o funcionalizados como éteres o aminas. En una realización, la posición 2' del residuo de furanosa está sustituida con cualquiera de un grupo OMe, O-alquilo, O-alilo, S-alquilo, S-alilo o halo. Los procedimientos de síntesis de azúcares modificados en 2' se describen, por ejemplo, en Sproat y col., Nucl. Acid Res. 19: 733-738 (1991); Cotten y col., Nucl. Acid Res. 19: 2629-2635 (1991); y Hobbs y col., Biochemistry 12: 5138-5145 (1973). Se conocen otras modificaciones por un experto en la técnica. Dichas modificaciones pueden ser modificaciones del procedimiento pre-SELEX™ o modificaciones del procedimiento post-SELEX™ (modificación de ligandos sin modificar previamente identificados), o puede hacerse por incorporación en el procedimiento SELEX™.

[0070] Las modificaciones del procedimiento pre-SELEX™ o las hechas por incorporación en el procedimiento SELEX dan ligandos de ácido nucleico tanto con especificidad por su diana SELEX™ como estabilidad mejorada, por ejemplo, estabilidad *in vivo*. Las modificaciones del procedimiento post-SELEX™ hechas a ligandos de ácido nucleico pueden producir estabilidad mejorada, por ejemplo, estabilidad *in vivo* sin afectar adversamente la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico.

[0071] El procedimiento SELEX™ incluye combinar oligonucleótidos seleccionados con otros oligonucleótidos seleccionados y unidades funcionales de no oligonucleótido como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.637.459 y la patente de Estados Unidos Nº 5.683.867. El procedimiento SELEX™ incluye adicionalmente combinar ligandos de ácido nucleico seleccionados con compuestos lipófilos o no inmunogénicos de alto peso molecular en un complejo de diagnóstico o terapéutico como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 6.011.020, la patente de Estados Unidos Nº 6.051.698 y la publicación PCT Nº WO 98/18480. Estas patentes y solicitudes muestran la combinación de una amplia matriz de formas y otras propiedades, con las propiedades de amplificación y replicación eficientes de los oligonucleótidos, y con las propiedades deseables de otras moléculas.

[0072] También se ha explorado la identificación de ligandos de ácido nucleico para péptidos flexibles pequeños mediante el procedimiento SELEX™. Los péptidos pequeños tienen estructuras flexibles y normalmente existen en solución en un equilibrio de múltiples conformeros y, por lo tanto, se pensó inicialmente que las afinidades de unión podrían limitarse por la entropía conformacional perdida tras la unión a un péptido flexible. Sin embargo, la viabilidad de la identificación de 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 por la sustancia P, un péptido de 11 aminoácidos.

[0073] Los aptámeros con especificidad y afinidad de unión por la(s) diana(s) de la presente memoria se seleccionan normalmente por el procedimiento SELEX™ como se describe en el presente documento. Como parte del procedimiento SELEX™, las secuencias seleccionadas que van a unirse a la diana se minimizan por tanto opcionalmente para determinar la secuencia mínima que tiene la afinidad de unión deseada. Las secuencias de aptámeros seleccionadas y/o las secuencias de aptámeros minimizadas se optimizan opcionalmente realizando una mutagénesis al azar o dirigida de la secuencia para aumentar la afinidad de unión o, como alternativa, para determinar qué posiciones en la secuencia son esenciales para la actividad de unión. Adicionalmente, las selecciones pueden realizarse con secuencias que incorporan nucleótidos modificados para estabilizar las moléculas de aptámero contra la degradación *in vivo*.

SELEX™ modificado en 2'

[0074] Para que un aptámero sea adecuado para su uso como un agente terapéutico, es preferiblemente barato de sintetizar, seguro y estable *in vivo*. Los aptámeros de ARN y ADN natural no son normalmente estables *in vivo* debido a su susceptibilidad a la degradación por nucleasas. La resistencia a la degradación por nucleasas puede aumentarse enormemente por la incorporación de grupos modificadores en la posición 2'.

[0075] Los grupos 2'-flúor y 2'-amino se han incorporado satisfactoriamente en bibliotecas de oligonucleótidos de las que se han seleccionado posteriormente aptámeros. Sin embargo, estas modificaciones aumentan enormemente el coste de la síntesis del aptámero resultante y pueden introducir asuntos de seguridad en algunos casos debido a la posibilidad de que los nucleótidos modificados pudieran recircularse en ADN huésped por degradación de los oligonucleótidos modificados y el uso posterior de los nucleótidos como sustratos para la síntesis de ADN.

[0076] Los aptámeros que contienen 2'-O-metil-nucleótidos ("2'-OMe"), como se proporciona en algunas realizaciones en el presente documento, superan muchos de estos inconvenientes. Los oligonucleótidos que contienen 2'-OMe-nucleótidos son resistentes a nucleasa y baratos de sintetizar. Aunque los 2'-OMe-nucleótidos son ubicuos en sistemas biológicos, las polimerasas naturales no aceptan 2'-OMe-NTP como sustratos en condiciones fisiológicas, por tanto, no hay problemas de seguridad con respecto a la recirculación de 2'-OMe-nucleótidos en ADN huésped. El procedimiento SELEX™ usado para generar aptámeros modificados con 2' se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos Nº 2004/0197804, y la solicitud de patente Nº 2005/0037394, titulada Method for *in vitro* Selection of 2'-OMe Substituted Nucleic Acids".

[0077] La presente invención incluye aptámeros que se unen a y modulan la función de la proteína del complemento C5 que contienen nucleótidos modificados (por ejemplo, nucleótidos que tienen una modificación en la posición 2') para hacer el oligonucleótido más estable que el oligonucleótido sin modificar a la degradación enzimática y química, así como a la degradación térmica y física. Aunque hay varios ejemplos de aptámeros que contienen 2'-OMe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Green y col., Current Biology 2, 683-695, 1995), éstos se generaron por la selección *in vitro* de bibliotecas de transcritos modificados en los que los residuos C y U estaban sustituidos con 2'-flúor (2'-F) y los residuos A y G eran 2'-OH. Una vez se identificaron secuencias funcionales, a continuación cada residuo A y G se probó para la tolerancia a la sustitución con 2'-OMe, y el aptámero se volvió a sintetizar con todos los residuos A y G que toleraban la sustitución con 2'-OMe como residuos 2'-OMe. La mayoría de los residuos A y G de aptámeros generados en este modo de dos etapas toleran la sustitución con residuos 2'-OMe aunque, en promedio, aproximadamente el 20% no lo toleran. Por consiguiente, los aptámeros generados usando este procedimiento tienden a contener de dos a cuatro residuos 2'-OH, y como resultado hay un equilibrio entre 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 las que se seleccionan los aptámeros y se enriquecen por SELEX™ (y/o cualquiera de sus variaciones y mejoras, que incluyen aquellas descritas en el presente documento), los procedimientos de la presente memoria eliminan la necesidad de estabilizar los oligonucleótidos de aptámeros seleccionados (por ejemplo, volviendo a sintetizar los oligonucleótidos de aptámeros con nucleótidos modificados).

[0078] La presente memoria proporciona aptámeros que comprenden combinaciones de modificaciones con 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi y 2'-OMe de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP. También se proporcionan aptámeros que comprenden combinaciones de modificaciones con 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH₂ y 2'-metoxietilo de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP. También se proporcionan aptámeros que comprenden 5⁶ combinaciones de modificaciones con 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH₂ y 2'-metoxietilo de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP.

[0079] Los aptámeros modificados en 2' de la presente memoria se crean usando polimerasas modificadas, por ejemplo, una polimerasa T7 modificada que tiene una velocidad de incorporación de nucleótidos modificados que tienen sustituyentes voluminosos en la posición 2' de furanosa que es superior a la de polimerasas naturales. Por ejemplo, una polimerasa T7 mutante (Y639F) en la que el residuo de tirosina en la posición 639 se ha cambiado por fenilalanina utiliza fácilmente 2'-desoxi-, 2'-amino- y 2'-fluoro-nucleótidos trifosfato (NTP) como sustratos y se ha usado ampliamente para sintetizar ARN modificados para una diversidad de aplicaciones. Sin embargo, esta polimerasa T7 mutante según se informa no puede utilizar fácilmente (es decir, incorporar) NTP con sustituyentes en 2' voluminosos, tales como los sustituyentes 2'-OMe o 2'-azido (2'-N₃). Para la incorporación de sustituyentes en 2' voluminosos, se ha descrito un mutante de la polimerasa T7 (Y639F/H784A) que tiene la histidina en la posición 784 cambiada a un residuo 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 Re., 2002, 30(24): 138. También se ha usado una ARN polimerasa T7 mutante H784A que tiene la histidina en la posición 784 cambiada a un residuo de alanina Padilla y col., Nucleic Acids Research, 2002, 30: 138. Tanto en las polimerasas de mutante doble Y639F/H784A como las T7 de un solo mutante H784A el cambio a un residuo de aminoácido más pequeño, tal como alanina, permite la incorporación de sustratos de nucleótidos más voluminosos, por ejemplo, nucleótidos sustituidos con 2'-O-metilo.

[0080] Generalmente se ha descubierto que en las condiciones desveladas en el presente documento el mutante

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

5

[0081] Los oligonucleótidos modificados en 2' pueden sintetizarse completamente por 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 contienen 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 tipos diferentes de modificación. Todos los nucleótidos de purina pueden tener un tipo de modificación (o están sin modificar), mientras que todos los nucleótidos de pirimidina tienen otro tipo de modificación diferente (o están sin modificar). De esta forma, los transcritos, o bibliotecas de transcritos, se generan usando cualquier combinación de modificaciones que incluye, por ejemplo, ribonucleótidos (2'-OH), desoxirribonucleótidos (2'-desoxi), nucleótidos 2'-F y 2'-OMe. Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-C y -U y 2'-OH-A y -G se denomina como una mezcla "rRmY", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros "rRmY". Una mezcla de transcripción que contiene 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 contiene 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 contiene alternativamente 2'-OMe-A, -C, -U y -G y 2'-OMe-A, -U y -C y 2'-F-G se denomina una "mezcla alternante", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de la "mezcla alternante". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, -U, -C y -G en la que 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 contiene 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 contiene 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 contiene 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 contiene todos los 2'-OH-nucleótidos se denomina una mezcla "rN", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros "rN", "rRrY". Un aptámero "mRmY" es uno que contiene todos los 2'-OMe-nucleótidos, y se obtiene normalmente a partir de un oligonucleótido r/mGmH mediante reemplazo post-SELEX, cuando es posible, de cualquier 2'-OH G con 2'-OMe G.

[0082] Los ejemplos descritos incluyen cualquier combinación de nucleótidos con 2'-OH-, 2'-desoxi- y 2'-OMe. Los ejemplos descritos incluyen cualquier combinación de nucleótidos con 2'-desoxi- y 2'-OMe en los que las pirimidinas son 2'-OMe (tal como dRmY, mRmY o dGmH).

[0083] La incorporación de nucleótidos modificados en los aptámeros de la invención se realiza antes (pre-) del procedimiento de selección (por ejemplo, una modificación del procedimiento pre-SELEX™). Opcionalmente, los aptámeros de la invención en los que los nucleótidos modificados se han incorporado por la modificación del procedimiento pre-SELEX™ pueden modificarse adicionalmente por un procedimiento de modificación post-SELEX™ (es decir, una modificación del procedimiento post-SELEX™ después de una modificación pre-SELEX™). Las modificaciones del procedimiento pre-SELEX™ dan ligandos de ácido nucleico modificados con especificidad para la diana SELEX™ y también una mejor estabilidad *in vivo*. Las modificaciones del procedimiento post-SELEX™, es decir, la modificación (por ejemplo, truncación, delección, sustitución o modificaciones de nucleótidos adicionales de ligandos previamente identificados que tienen nucleótidos incorporados por modificación del procedimiento pre-SELEX™) puede producir una mejora adicional de la estabilidad *in vivo* sin afectar adversamente la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico que tiene nucleótidos incorporados por modificación del procedimiento pre-SELEX™.

50

[0084] Para generar grupos de transcritos de ARN modificados en 2' (por ejemplo, 2'-OMe) en condiciones bajo las que una polimerasa acepta los NTP modificados en 2', la polimerasa preferida es la polimerasa de doble mutante Y639L/H784A o la de un solo mutante Y693F. También pueden usarse otras polimerasas, particularmente las que presentan una alta tolerancia por sustituyentes en 2' voluminosos. Dichas polimerasas pueden explorarse para comprobar su capacidad ensayando su capacidad para incorporar nucleótidos modificados en las condiciones de transcripción descritas en el presente documento.

[0085] Se ha determinado que varios factores son importantes para las condiciones de transcripción útiles en los procedimientos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, se observan aumentos en los rendimientos de transcrito modificado cuando una secuencia conductora se incorpora en el extremo 5' de una secuencia fija en el extremo 5' de la plantilla de transcripción de ADN, tal forma que al menos aproximadamente los primeros 6 residuos del transcrito resultante sean purinas.

[0086] Otro factor importante en la obtención de transcritos que incorporan nucleótidos modificados es la presencia o concentración de 2'-OH GTP. La transcripción puede dividirse en dos fases: la primera fase es la iniciación, durante la que un NTP se añade al extremo hidroxilo en 3' de GTP (u otra guanosina sustituida) para dar un

dinucleótido que luego se extiende aproximadamente 10-12 nucleótidos; la segunda fase es la elongación, durante la que la transcripción avanza más allá de la adición de los primeros aproximadamente 10-12 nucleótidos. Se ha descubierto que pequeñas cantidades de 2'-OH-GTP añadidas a una mezcla de transcripción que contiene un exceso de 2'-OMe-GTP son suficientes para permitir que la polimerasa inicie la transcripción usando 2'-OH-GTP, pero una vez la transcripción entra en la fase de elongación, la discriminación reducida entre 2'-OMe- y 2'-OH-GTP, y el exceso de 2'-OMe-GTP con respecto a 2'-OH-GTP, permite la incorporación de principalmente el 2'-OMe-GTP.

[0087] Otro factor importante en la incorporación de nucleótidos sustituidos con 2'-OMe en transcritos es el uso de tanto magnesio como manganeso divalente en la mezcla de transcripción. Se ha descubierto que diferentes combinaciones de concentraciones de cloruro de magnesio y cloruro de manganeso afectan el rendimiento de los transcritos 2'-O-metilados, dependiendo la concentración óptima del cloruro de magnesio y de manganeso de la concentración en la mezcla de reacción de transcripción de NTP que complejan iones metálicos divalentes. Para obtener el mayor rendimiento de transcritos máximamente 2'-O-metilados (es decir, todos los 2'-OMe-A, -C y -U y aproximadamente el 90% de los nucleótidos G) se prefieren concentraciones de aproximadamente cloruro de magnesio 5 mM y cloruro de manganeso 1,5 mM cuando cada NTP está presente a una concentración de 0,5 mM. Si la concentración de cada NTP es 1,0 mM se prefieren concentraciones de aproximadamente cloruro de magnesio 6,5 mM y cloruro de manganeso 2,0 mM. Si la concentración de cada NTP es 2,0 mM, se prefieren concentraciones de aproximadamente cloruro de magnesio 9,5 mM y cloruro de manganeso 3,0 mM. En cualquier caso, las desviaciones de estas concentraciones de hasta dos veces todavía dan cantidades significativas de transcritos modificados.

[0088] También es importante la transcripción por cebado con GMP o guanosina. Este efecto resulta de la especificidad de la polimerasa por el nucleótido de iniciación. Como resultado, es probable que el nucleótido del extremo 5' de cualquier transcrito generado de este modo sea 2'-OH-G. La concentración preferida de GMP (o guanosina) es 0,5 mM e incluso más preferiblemente 1 mM. También se ha descubierto que incluir PEG, preferiblemente PEG-8000, en la reacción de transcripción es útil para maximizar la incorporación de nucleótidos modificados.

[0089] Para la máxima incorporación de 2'-OMe-ATP (100%), -UTP (100%), -CTP (100%) y -GTP (~90%) ("r/mGmH") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 al 10% (p/v), Triton X-100 al 0,01% (p/v), MgCl₂ 5 mM (6,5 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 1,0 mM), MnCl₂ 1,5 mM (2,0 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 1,0 mM), 2'-OMe-NTP (cada uno) 500 µM (más preferiblemente 1,0 mM), 2'-OH-GTP 30 µM, 2'-OH-GMP 500 µM, pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F/H784A 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml, y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud. Como se usa en el presente documento, una unidad de la ARN polimerasa T7 mutante Y639F/H784A (o cualquier otra ARN polimerasa T7 mutante especificada en el presente documento) se define como la cantidad de enzima requerida para incorporar 1 nmol de 2'-OMe-NTP en transcritos en las condiciones de r/mGmH. Como se usa en el presente documento, una unidad de pirofosfatasa inorgánica se define como la cantidad de enzima que liberará 1,0 mol de ortofosfato inorgánico por minuto a pH 7,2 y 25 °C.

[0090] Para la incorporación máxima (100%) de 2'-OMe-ATP, -UTP y -CTP ("rGmH") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 al 10% (p/v), Triton X-100 al 0,01% (p/v), MgCl₂ 5 mM (9,6 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 2,0 mM), MnCl₂ 1,5 mM (2,9 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 2,0 mM), 2'-OMe-NTP (cada uno) 500 µM (más preferiblemente 2,0 mM), pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml, y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud.

[0091] Para la incorporación máxima (100%) de 2'-OMe-UTP y -CTP ("rRmY") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 al 10% (p/v), Triton X-100 al 0,01% (p/v), MgCl₂ 5 mM (9,6 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 2,0 mM), MnCl₂ 1,5 mM (2,9 mM si la concentración de cada 2'-OMe-NTP es 2,0 mM), 2'-OMe-NTP (cada uno) 500 µM (más preferiblemente 2,0 mM), pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F/H784A 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml, y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud.

[0092] Para la incorporación máxima (100%) de desoxi-ATP y -GTP y 2'-OMe-UTP y -CTP ("dRmY") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermina 2 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 al 10% (p/v), Triton X-100 al 0,01% (p/v), MgCl₂ 9,6 mM, MnCl₂ 2,9 mM, 2'-OMe-NTP (cada uno) 2,0 mM, pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud.

[0093] Para la incorporación máxima (100%) de 2'-OMe-ATP, -UTP y -CTP y 2'-F-GTP ("fGmH") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 al 10% (p/v), Triton X-100 al 0,01 % (p/v), MgCl₂ 9,6 mM, MnCl₂ 2,9 mM, 2'-OMe-NTP (cada uno) 2,0 mM, pH 7,5, ARN Polimerasa T7 Y639F 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud.

[0094] Para la incorporación máxima (100%) de desoxi-ATP y 2'-OME-UTP, -GTP y -CTP ("dAmB") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG8000 al 10% (p/v), Triton X-100 al 0,01 % (p/v), MgCl₂ 9,6 mM, MnCl₂ 2,9 mM, 2'-OME-NTP (cada uno) 2,0 mM, pH 7,5, ARN 5 polimerasa T7Y69F 15 unidades/ml, pirofosfatasa inorgánica 5 unidades/ml, y una secuencia conductora de todas las purinas de al menos 8 nucleótidos de longitud.

[0095] Para cada una de lo anterior (a) la transcripción se realiza preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 50 °C, preferiblemente de aproximadamente 30 °C a 45 °C, y más
10 preferiblemente a aproximadamente 37 °C durante un periodo de al menos dos horas, y (b) se usa una plantilla de transcripción de ADN bicatenario 50-300 nM (se usa una plantilla 200 nM en la ronda 1 para aumentar la diversidad (se usa una plantilla 300 nM en las transcripciones dRMY)), y para las rondas posteriores se usa aproximadamente 50 nM, una dilución 1/10 de una reacción de PCR optimizada usando condiciones descritas en el presente documento). Las plantillas de transcripción de ADN preferidas se describen más adelante (cuando ARC254 y
15 ARC256 transcriben en todas las condiciones de 2'-OMe y ARC255 transcribe en condiciones de rRMY).

ARC254 (SEQ ID NO: 99):

5'-CATCGATGCTAGTCGTAAACGATCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNCGAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

ARC255 (SEQ ID NO: 100):

5'-CATGCATCGCGACTGACTAGCCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATT-3'

ARC256 (SEQ ID NO: 101):

**5'-CATCGATCGATCGATCGACAGCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATT-3'**

[0096] En las condiciones de transcripción rN de la presente memoria, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OH-adenosina trifosfatos (ATP), 2'-OH-guanosina trifosfatos (GTP), 2'-OH-citidina trifosfatos (CTP) y 2'-OH-uridina trifosfatos (UTP). Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción rN de la presente memoria comprenden sustancialmente todos 2'-OH-adenosina, 2'-OH-guanosina, 2'-OH-citidina y 2'-OH-uridina. En una realización preferida de la transcripción rN, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 80% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH-adenosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OH-citidina y al menos el 80% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OH-uridina. En una realización más preferida de la transcripción rN, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 90% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH adenosina, 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'-OH-citidina y al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OH-uridina. En la realización más preferida de la transcripción rN, los oligonucleótidos modificados comprenden una secuencia en la que el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OH adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH-guanosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OH-citidina y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OH-uridina.

[0097] En las condiciones de transcripción rRmY de la presente memoria, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OH adenosina trifosfatos, 2'-OH guanosina trifosfatos, 2'-OME citidina trifosfatos, y 2'-OME uridina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción rRmY de la presente memoria comprenden sustancialmente todos 2'-OH adenosina, 2'-OH guanosina, 2'-OME citidina y 2'-OME uridina.

40 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'-OH adenosina, al menos el 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 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

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

adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH guanosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina.

[0098] En las condiciones de transcripción dRmY de la presente memoria, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-desoxi adenosina trifosfatos, 2'-desoxi guanosina trifosfatos, 2'-O-metil citidina trifosfatos, y 2'-O-metil uridina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las condiciones de transcripción dRmY de la presente memoria comprenden sustancialmente todas las 2'-desoxi adenosina, 2'-desoxi guanosina, 2'-O-metil citidina, y 2'-O-metil uridina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 80% de todos los nucleótidos son 2'-desoxi adenosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-desoxi guanosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil citidina, y al menos el 80% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil 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 guanosina son 2'-desoxi guanosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil citidina, y al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil uridina. En la realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes 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 guanosina son 2'-desoxi guanosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil citidina, y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil uridina.

[0099] En las condiciones de transcripción rGmH de la presente memoria, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OH guanosina trifosfatos, 2'-OMe citidina trifosfatos, 2'-OMe uridina trifosfatos, y 2'-OMe adenosina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción rGmH de la presente memoria comprenden sustancialmente todos 2'-OH guanosina, 2'-OMe citidina, 2'-OMe uridina y 2'-OMe adenosina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia en la que al menos el 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 la 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'-OMe adenosina.

[00100] En las condiciones de transcripción r/mGmH de la presente memoria, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OMe adenosina trifosfato, 2'-OMe citidina trifosfato, 2'-OMe guanosina trifosfato, 2'-OMe uridina trifosfato y 2'-OH guanosina trifosfato. Los oligonucleótidos modificados resultantes producidos usando las mezclas de transcripción r/mGmH de la presente memoria comprenden sustancialmente todas las 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 el 10% de 2'-OH guanosina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados r/mGmH 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 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 la 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, 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.

[00101] En las condiciones de transcripción fGmH de la presente memoria, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OMe adenosina trifosfatos, 2'-OMe uridina trifosfatos, 2'-OMe citidina trifosfatos, y 2'-F guanosina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las condiciones de transcripción fGmH de la presente memoria comprenden sustancialmente todas las 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 la 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.

[00102] En las condiciones de transcripción dAmB de la presente memoria, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-desoxi adenosina trifosfatos, 2'-OMe citidina trifosfatos, 2'-OMe guanosina trifosfatos, y 2'-OMe uridina trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción dAmB de la presente memoria comprenden sustancialmente todas las 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 la realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes 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.

[00103] En cada caso, los productos de transcripción pueden usarse entonces como la biblioteca en el procedimiento SELEX™ para identificar aptámeros y/o para determinar un motivo conservado de secuencias con especificidad de unión a una diana determinada. Las secuencias resultantes ya están estabilizadas, eliminándose esta etapa del procedimiento para llegar a una secuencia de aptámeros optimizada y dando como resultado un aptámero más altamente estabilizado. Otra ventaja del procedimiento SELEX™ de 2'-OMe es que es probable que las secuencias resultantes tengan menos 2'-OH-nucleótidos requeridos en la secuencia, posiblemente ninguno. Hasta el punto que los 2'-OH-nucleótidos que quedan pueden eliminarse realizando modificaciones post-SELEX™.

[00104] Como se describe más adelante, pueden obtenerse rendimientos menores pero todavía útiles de los transcritos que incorporan completamente nucleótidos sustituidos en 2' en condiciones distintas a las condiciones optimizadas que se han descrito anteriormente. Por ejemplo, las variaciones para las condiciones de transcripción anteriores incluyen:

[00105] La concentración de tampón HEPES puede variar de 0 a 1 M. La presente memoria también contempla el uso de otros agentes tamponantes que tienen una pKa entre 5 y 10 que incluyen, por ejemplo, tris(hidroximetil)aminometano.

[00106] La concentración de DTT puede variar de 0 a 400 mM. Los procedimientos de la presente memoria también proporcionan el uso de otros agentes reductores que incluyen, por ejemplo, mercaptoetanol.

[00107] La concentración de espermidina y/o espermina puede variar de 0 a 20 mM.

[00108] La concentración de PEG-8000 puede variar del 0 al 50 % (p/v). Los procedimientos de la presente memoria también proporcionan el uso de otro polímero hidrófilo que incluye, por ejemplo, PEG de otro peso molecular u otros polialquilenglicoles.

[00109] La concentración de Triton X-100 puede variar del 0 al 0,1% (p/v). Los procedimientos de la presente memoria también proporcionan el uso de otros detergentes no iónicos que incluyen, por ejemplo, otros detergentes que incluyen otros detergentes de Triton-X.

[00110] La concentración de $MgCl_2$ puede variar de 0,5 mM a 50 mM. La concentración de $MnCl_2$ puede variar de 0,15 mM a 15 mM. Tanto $MgCl_2$ como $MnCl_2$ deben estar presentes dentro de los intervalos descritos y en una realización preferida están presentes en aproximadamente una relación de 10 a aproximadamente 3 de $MgCl_2:MnCl_2$, preferiblemente, la relación es aproximadamente 3-5:1, más preferiblemente, la relación es aproximadamente 3-4:1.

[00111] La concentración de 2'-OMe-NTP (cada NTP) puede variar de 5 μM a 5 mM.

[00112] La concentración de 2'-OH GTP puede variar de 0 μM a 300 μM .

[00113] La concentración de 2'-OH GMP puede variar de 0 a 5 mM.

[00114] El pH puede variar de pH 6 a pH 9. Los procedimientos de la presente memoria pueden ponerse en

práctica dentro del intervalo de pH de la actividad de la mayoría de las polimerasas que incorporan nucleótidos modificados. Además, los procedimientos de la presente memoria proporcionan el uso óptimo de agentes quelantes en la condición de reacción de transcripción incluyendo, por ejemplo, EDTA, EGTA y DTT.

- 5 **[00115]** Los aptámeros seleccionados que tienen la mayor afinidad y unión específica como se demuestra mediante los ensayos biológicos que se describen en los siguientes ejemplos, son agentes terapéuticos adecuados para el tratamiento de afecciones en las que la proteína del complemento C5 está implicada en la patogénesis

Aptámeros con Afinidad de Unión a la Proteína del Sistema del Complemento C5

10

[00116] Aunque el sistema del complemento tiene una función importante en el mantenimiento de la salud, tiene el potencial de provocar o contribuir a la 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 ya que es un componente tanto de la vía clásica como la alternativa de las cascadas de activación del complemento (Matis y Rollins (1995) *Nature Medicine* 1(8): 839-842). Por consiguiente, la inhibición de C5 puede impedir un daño mediado por el complemento causado por cualquier vía. Algunas proteínas del sistema del complemento, tales como C1q y C3, son importantes en los mecanismos de defensa normales frente a microorganismos y en la eliminación de componentes inmunes y tejido dañado; sin embargo, C5 es relativamente poco importante para estas funciones. Por lo tanto, la función de C5 puede inhibirse durante cortos o largos periodos de tiempo sin comprometer la función protectora del sistema del complemento.

- 25 **[00117]** También es deseable un inhibidor terapéutico de C5 puesto que la escisión de inhibición de C5 impide la generación de dos actividades del complemento potencialmente dañinas. En primer lugar, la inhibición de la generación de C5a de la escisión de C5 elimina la actividad quimiotáctica y vasoactiva del complemento principal. En segundo lugar, la inhibición de la generación de C5b de la escisión de C5 bloquea el conjunto del complejo de ataque a membrana C5b-9 citolítica ("MAC"). La inhibición de la escisión de C5 bloquea tanto los efectos de C5a como los de C5b en los leucocitos y sobre el tejido, tal como las células endoteliales (Ward (1996) *Am. J. Pathol.* 149: 1079).

- 30 **[00118]** Tanto C5a como el MAC han estado implicados en la inflamación aguda y crónica relacionada con una enfermedad humana, y su función en las patologías se ha confirmado en modelos de animales. Se requiere C5a para una lesión vascular pulmonar dependiente del complemento y neutrófilos (Ward (1997) *J. Lab. Clin. Med.* 129: 400; Mulligan y col., (1998) *J. Clin. Invest.* 98: 503), y está relacionado con la activación de neutrófilos y plaquetaria en un shock y en una lesión por quemadura (Schmid y col., (1997) *Shock* 8: 119). El MAC media la lesión muscular en la miastenia gravis aguda autoinmune (Biesecker y Gomez (1989) *J. Immunol.* 142: 2654), rechazo del órgano en trasplante (Baldwin y col., (1995) *Transplantation* 59: 797; Brauer y col., (1995) *Transplantation* 59: 288; Takahashi y col., (1997) *Immunol. Res.* 16: 273), y lesión renal en glomerulonefritis autoinmune (Biesecker (1981) *J. Exp. Med.* 39: 1779; Nangaku (1997) *Kidney Int.* 52: 1570). Tanto C5a como el MAC están implicados en la isquemia de miocardio aguda (Homeister y Lucchesi (1994) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 17), lesión del SNC aguda (Bednar y col., (1997) *J. Neurosurg.* 86: 139) y crónica (Morgan (1997) *Exp. Clin. Immunogenet.* 14: 19), activación leucocitaria durante la circulación extracorpórea (Sun y col., (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 2909; Spycher y Nydegger (1995) *Infusionsther. Transfusionsmed.* 22: 36) y una lesión tisular relacionada con enfermedades autoinmunes, incluyendo artritis y lupus (Wang y col., (1996) *Immunology* 93: 8563).

- 45 **[00119]** La activación del complemento también ha estado implicada en la retinopatía diabética, y puede componer o iniciar un daño vascular retiniano (Zhang y col., (2002) *Diabetes* 51: 3499). La activación del complemento constitutiva de bajo nivel tiene lugar en el eje no diabético, lo que se evidencia por la presencia de MAC y proteínas reguladoras del complemento en los ojos de ratas no diabéticas, indicando que tiene lugar una alteración del complemento en los pacientes diabéticos (Sohn y col., (2000) *IOVS* 41: 3492). Además, se ha detectado la deposición de C5b-9 en vasos de la retina de donantes humanos diabéticos en los que no había donantes humanos no diabéticos (Zhang y col.), se muestra una expresión reducida de CD55 y CD59 en retinas diabéticas (Zhang y col.), y está presente CD59 glicado en la orina de pacientes diabéticos, pero en los pacientes no diabéticos (Acosta y col., (2002) *PNAS* 97, 5450-5455). Adicionalmente, se sabe que el sistema del complemento y vascular se activará en la diabetes de tipo I. Véase, por ejemplo, Hansen, T.K. y col., *Diabetes*, 53: 1570-1576 (2004). C5a activa las células endoteliales a través de la interacción con los sistemas inmune y del complemento. Véase, por ejemplo, Albrecht, E.A. y col., *Am J Pathology*, 164: 849-859 (2004). El sistema vascular se activa en enfermedades oculares, incluyendo la retinopatía diabética. Véase, por ejemplo, Gert, V.B. y col., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 1104-1108 (2002). El sistema del complemento también se activa en la retinopatía diabética. Véase, por ejemplo, Gert, V.B. y col., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 1104-1108 (2002) y Badouin, C y col., *Am J Ophthalmol*, 105: 383-388 (1988).

60

[00120] En algunas realizaciones, los materiales de la presente memoria comprenden una serie de aptámeros de ácido nucleico de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, que se unen de manera específica a la proteína del complemento C5, y que modulan funcionalmente, por ejemplo, bloquean, la actividad de la proteína del complemento C5 en ensayos *in vivo* y/o basados en células.

65

[00121] Se describen aptámeros que son capaces de unirse de manera específica y modular la proteína del

complemento C5. Estos aptámeros proporcionan una realización de baja toxicidad, segura y efectiva para tratar, mejorar y/o prevenir una diversidad de enfermedades o trastornos relacionados con el complemento, incluyendo, por ejemplo, trastornos cardíacos relacionados con el complemento (por ejemplo, lesión del miocardio; complicaciones del complemento mediadas por C5 relacionadas con la cirugía de revascularización coronaria (CABG), tales como sangrado postoperatorio, activación sistémica de los neutrófilos y leucocitos, aumento del riesgo de infarto de miocardio, y aumento de la disfunción cognitiva; restenosis y complicaciones del complemento mediadas por C5 que se relacionan con la intervención coronaria percutánea), lesión por isquemia-reperfusión (por ejemplo, infarto de miocardio, ictus, quemadura por frío), trastornos inflamatorios relacionados con el complemento (por ejemplo, asma, artritis, sepsis, y rechazo después del trasplante de órganos), y trastornos autoinmunes relacionados con el complemento (por ejemplo, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico (LES)). Otras indicaciones para las cuales la inhibición de C5 es deseable, incluyen, por ejemplo, inflamación del pulmón (Mulligan y col. (1998) J. Clin. Invest. 98: 503), activación del complemento extracorpóreo (Rinder y col. (1995) J. Clin. Invest. 96: 1564), activación del complemento mediada por anticuerpos (Biesecker y col. (1989) J. Immunol. 142: 2654), glomerulonefritis y otras enfermedades renales, indicaciones oculares, tales como daño del tejido ocular mediado por C5, por ejemplo, retinopatía diabética y hemoglobinuria nocturna paroxisomal. Estos aptámeros también pueden utilizarse en el diagnóstico.

[00122] Estos aptámeros pueden incluir modificaciones como se describe en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, la conjugación con compuestos lipófilos o de alto peso molecular (por ejemplo, PEG), la incorporación de un resto de protección, la incorporación de nucleótidos modificados y modificaciones a la cadena principal del fosfato.

[00123] En el presente documento se proporciona un aptámero no natural aislado, que se une a la proteína del complemento C5. En algunas realizaciones, el aptámero 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 mediante titulación de transferencia ("dot blot"), tal como se describe en el Ejemplo 1 que se indica a continuación.

[00124] En otra realización, el aptámero modula una función de la proteína del complemento C5. En otra realización, el aptámero inhibe una función de la proteína del complemento C5 mientras que en otra realización, el aptámero estimula una función de C5. Una variante de la proteína del complemento C5 como se usa en el presente documento, incluye variantes que realizan básicamente la misma función que una función de la proteína del complemento C5. Una variante de la proteína del complemento C5 comprende de manera preferida, sustancialmente la misma estructura y en algunas realizaciones, comprende una identidad de secuencia del 80%, más preferiblemente el 90% de identidad de secuencia, y más preferiblemente el 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de la proteína del complemento C5, que comprende la secuencia aminoacídica que se muestra a continuación (SEQ ID NO: 102) (citada en Haviland y col., J Immunol. 1 de enero de 1991; 146 (1): 362-8):

40

```

1  mglilgilcfl iflgktwgge qtyvisapki frvgaseniv iqvygyteaf datisiksyp
61  dkkfsysssh vhlssenkhq nsailtiqpk qlpggqnpvs yvylevvskh fskskrmpit
121 ydngflfiht dkpvypdqg vkvrvislnd dlkpakretv ltfidpegse vdmveeidhi
181 giisfpdfki psnprygmwt ikakykedfs ttgtayfevk eyvlphfsvs iepeynfigy
241 knfknfeiti karyfynkvv teadvytifg iredlkddqk emmqtamqnt mlingiaqvt
301 fdsetavkel syysledlnn kylyiavtvi estggfseea eipgikyvlv pyklnlvatp
361 lflkpgipyp ikvqvksld qlvggvpvtl naqtidvnge tsdldpsksv trvddgvasf
421 vlnlpsgvtv lefnvktadp dlpeengare gyraiayssl sqsylyidwt dnhkallvge
481 hlniivtpks pyidkithyn ylilskgkii hfgtrekfsd asyqsinipt tqnmvpsrl
541 lvyiivtgeq taelvsdsvw lnieekcgnq lqvhlspdad ayspgqtvsl nmatgmdswv
601 alaavdsavy gvqrgakkpl ervfqfleks dlqcgagggl nnanvfhlag ltflltnanad
661 dsqendepck eilrprrtlq kkieeiaaky khsvvkkccy dgacvnnDET ceqraarisl
721 gprcikafte ccvvasqlra nishkdmqlg rllhmktllpv skpeirsyfp eswlwevhlv
781 prrkqlqfal pdsllttweiq gvgisntgic vadtvkakvf kdvflemnlp ysvvrgeqiq
841 lkgtvynyrst sgmgfcvkms avegictses pvidhggtkS skcvrqkveg ssshlvtftv
901 lpleiglhni nfsletwfgk eilvktlrsv pegvkresys gvtldprgiy gtisrrkefp
961 yripldlvpk teikrilsvk gllvgeilsa vlsqeginil thlpkgsaea elmsvvpvfy
1021 vfhyletgnh wnifhsdpli ekqklkkklk egmlsim syr nadysysvkw ggsastwlta
1081 falrvlgqvn kyvegnqnsi cnsllwlven yqldngsfke nsqyqpiklq gtlpvearen
1141 slyltaftvi girkafdicp lvkidlalik adnflentl paqstftlai sayalslgdk
1201 thpqfrsivs alkrealvkg npdiyrfwkd nlghkdssvp ntgtarmvet tayalltsln
1261 lkdinyvnpv ikwlseeqry gggfystqdt inaiegltey sllvkqlrls mdidvsykhk
1321 galhnykmtD knflgrpvev llnddlivst gfgsglatvh vttvvhktst seevcsfylk
1381 idtqdieash yrgygnsdyk rivacasykp sreesssgss havmdislpT gisaneedlk
1441 alvegvdqlf tdyqikdghv ilqlnsipss dflcvrfrif elfevgflsp atftvyeyhr
1501 pdkqctmfys tsnikiqkvc egaackcvea dcgqmgeeld ltisaetrkq tackpeiaya
1561 ykvsitsitv envfvkykat lldiyktgea vaekdseitf ikkvctctnae lvkgrqylim
1621 gkealqikyn fsfryiypld sltwiewwpr dtccsscqaf lanldefaed iflngc

```

[00125] La identidad de secuencia de las variantes diana se determina usando BLAST como se describe a continuación. La expresión "identidad de secuencia" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de residuos aminoacídicos o nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan o se alinean para la correspondencia máxima, como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante inspección visual. Para la comparación de la secuencia, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de las subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de la secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula entonces el porcentaje de identidad de la secuencia para la secuencia o secuencias de prueba con relación a la secuencia de referencia, en base a los parámetros designados del programa. La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Programas de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (véase generalmente, Ausubel y col., a continuación).

[00126] Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia, es el algoritmo usado en la herramienta de búsqueda de la alineación local básica (en lo sucesivo en el presente documento "BLAST"), véase, por ejemplo, Altschul y col., J Mol. Biol. 215: 403-410 (1990) y Altschul y col., Nucleic Acids Res., 15: 3389-3402 (1997). El programa para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología (en lo sucesivo en el presente documento "NCBI"). Los parámetros por defecto usados en la determinación de la identidad de la secuencia usando el programa disponible de NCBI, por ejemplo, BLASTN (para secuencias nucleotídicas) y BLASTP (para secuencias aminoacídicas), se describen en McGinnis y col., Nucleic Acids Res., 32: W20-W25 (2004).

[00127] En otra realización de la presente memoria, el aptámero tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a la proteína del complemento C5 que un aptámero que comprende cualquiera de: las SEQ ID NOS 1-2, 5-67, 75-81, 83 u 88-98. En otra realización, el aptámero tiene sustancialmente la misma estructura y capacidad de unirse a la proteína del complemento C5 que un aptámero que comprende cualquiera de: las SEQ ID NOS 1-2, 5-67, 75-81, 83 u 88-98. En otra realización, los aptámeros tienen una secuencia, incluyendo cualquier modificación química,

de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NOS: 2, 5-67, 75-81, 83 u 88-98. En otra realización, los aptámeros se usan como un principio activo en las composiciones farmacéuticas. En otra realización, los aptámeros o composiciones que comprenden los aptámeros de la presente memoria, se usan para tratar una diversidad de enfermedades o trastornos relacionados con el complemento, incluyendo una cualquiera seleccionada del grupo que

5 consiste en: trastornos cardiacos relacionados con el complemento

[00128] (por ejemplo, lesión de miocardio; complicaciones del complemento mediadas por C5 relacionadas con la cirugía de revascularización coronaria (CABG), tales como sangrado postoperatorio, activación sistémica de los neutrófilos y leucocitos, aumento del riesgo de infarto de miocardio, y aumento de la disfunción cognitiva; restenosis;

10 y complicaciones del complemento mediadas por C5 que se relacionan con la intervención coronaria percutánea), lesión por isquemia-reperusión (por ejemplo, infarto de miocardio, ictus, quemadura por frío), trastornos inflamatorios relacionados con el complemento (por ejemplo, asma, artritis, sepsis y rechazo después del trasplante de órganos), y trastornos autoinmunes relacionados con el complemento (por ejemplo, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico (LES), inflamación del pulmón, activación del complemento extracorpóreo, activación del

15 complemento mediada por anticuerpos e indicaciones oculares, tales como daño del tejido ocular mediado por el complemento, tal como retinopatía diabética.

[00129] En una realización, los aptámeros anti-C5 incluyen una mezcla de nucleótidos modificados con 2'-flúor, nucleótidos modificados con 2'-OMe ("2'-OMe") y residuos de 2'-OH purina. A continuación, se muestra una

20 secuencia genérica descriptiva (SEQ ID NO: 1) para un aptámero anti-C5 modificado en la Tabla 1, y la estructura se muestra en la figura 3A. La gran mayoría de purinas (A y G), se han modificado para 2'-OMe, excluyendo sólo dos residuos de G que permanecen en 2'-OH (residuos mostrados con contorno). Los residuos encerrados en un círculo representan un subconjunto de pirimidinas que pueden modificarse simultáneamente para 2'-H sin alterar sustancialmente la actividad anti-C5 del aptámero (véase ARC330 en la Tabla 1 que se muestra a continuación

25 (SEQ ID NO: 2, figura 3B)). Los residuos subrayados mostrados en la figura 3A representan los residuos de pirimidina que pueden contener una modificación 2'-flúor o 2'-H (pero no 2'-OMe), mientras que los residuos en un recuadro representan residuos de pirimidina que pueden contener una modificación 2'-flúor o 2'-OMe (pero no 2'-H). Los residuos indicados con una flecha (→), deben contener una modificación 2'-flúor. Sin una modificación 2'-flúor en los residuos indicados por una flecha (→), la actividad hemolítica resultante del aptámero resultante disminuye

30 sustancialmente. En una realización preferida, un aptámero anti-C5 de la presente memoria comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

[00130] Un ejemplo de un aptámero anti-C5 según la presente memoria es ARC186 (SEQ ID NO: 4), que se muestra en la figura 3C y se describe en la patente de Estados Unidos Nº de Serie 6.395.888. Los 21 residuos de

35 pirimidina de ARC186 tienen modificaciones 2'-flúor. La mayoría de las purinas (14 residuos), tienen modificaciones 2'-OMe, excepto para tres residuos de 2'-OH purina (mostrados con contorno en la figura 3C). Los aptámeros anti-C5 de la presente memoria también pueden incluir diferentes mezclas de modificaciones 2'-flúor y 2'-H. Por ejemplo, otro aptámero anti-C5 descrito es el ARC330 (SEQ ID NO: 2), mostrado en la figura 3B. ARC330 (SEQ ID NO: 2) contiene siete modificaciones 2'-H (residuos encerrados en círculos en la figura 3B), 14 residuos de pirimidina con

40 modificaciones 2'-flúor, 14 residuos de purina residuos con modificaciones 2'-OMe, y tres residuos de 2'-OH purina (mostrados con contorno en la figura 3B).

[00131] Otras combinaciones de aptámeros que contienen una mezcla de modificaciones 2'-flúor, modificaciones 2'-OMe, residuos de 2'-OH purina, y la conjugación con compuestos no inmunogénicos de alto peso molecular (por

45 ejemplo, PEG) de tamaño variable, cada uno de los cuales se obtuvo a partir de ARC186 (SEQ ID NO: 4), se describen en la Tabla 1 que se muestra a continuación. La presente memoria proporciona aptámeros tal como se describen en la tabla 1 siguiente, así como aptámeros que carecen o que comprenden adicionalmente una corona 3' (por ejemplo, dT invertido).

50 **[00132]** A menos que se indique otra cosa, las secuencias nucleotídicas en la Tabla 1 que se muestra a continuación se enumeran en la dirección 5' a 3'. Para cada una de las secuencias individuales en la Tabla 1, todas las modificaciones 2'-OMe purina o pirimidina se indican por "m", que precede al nucleótido correspondiente; todas las modificaciones de 2'-flúor pirimidina se indican por "f", que precede al nucleótido correspondiente; todas las modificaciones de purina o desoxi pirimidina se indican por "d", que precede el nucleótido correspondiente; y

55 cualquier purina o pirimidina que aparezca sin "m", "f" o "d" precediendo al nucleótido, indica un residuo 2'-OH.

[00133]

Tabla 1:

60 SEQ ID NO: 1

X₁X₂fCfCrGfCX₃X₄fUX₅X₆X₇X₉X₁₀X₁₁fGX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃fUfUX₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈fCX₂₉

donde:

X₁ = fC o mC

65 X₂ = rG o mG

X₃ = rG o mG

- X₄ = rG o mG
X₅ = fC o dC
X₆ = fU o dT
X₇ = fC o dC
5 X₈ = rA o mA
X₉ = rG o mG
X₁₀ = rG o mG
X₁₁ = fC o dC
X₁₂ = fC o mC
10 X₁₃ = fU o mU
X₁₄ = rG o mG
X₁₅ = rA o mA
X₁₆ = rG o mG
X₁₇ = fU o dT
15 X₁₈ = fC o dC
X₁₉ = fU o dT
X₂₀ = rG o mG
X₂₁ = rA o mA
X₂₂ = rG o mG
20 X₂₃ = fU o dT
X₂₄ = rA o mA
X₂₅ = fC o dC
X₂₆ = fC o dC
X₂₇ = fU o dT
25 X₂₈ = rG o mG
X₂₉ = rG o mG
- ARC330 (SEQ ID NO: 2)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG
30
- ARC185 (SEQ ID NO: 3)
GAfCGAfUGfCGGfUfCfUfCAfUGfCGfUfCGAGfUGfUGAGfUfUfUAfCfCfUfUfCGfUfC
- ARC186 (SEQ ID NO: 4)
35 fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T
- ARC 187 (SEQ DD NO: 5)
40kDa PEG-- NH-
fGmGfCfGGfCmGmGfUfGfUfGmAmGmGfCGfCGfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAJAfGfCfUmGfCmG-3T
40 Donde el PEG ramificado de 40 kDa es 1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida)
- ARC188 (SEQ ID NO: 6)
AGGAfCGAfUGfCGGfUfCfUfCAfUGfCGfUfCGAGfUGfUAGfUfUfUAfCfCfUfUfCGfUfC
- 45 ARC189 (SEQ ID NO: 7)
AGfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG
- ARC250 (SEQ ID NO: 8)
GGfCGfCfCGfCGGfUfCfUfCAGGfCGfCfUGAGfUfCfUGAGfUfUfUAfCfCfUGfCG
50
- ARC296 (SEQ ID NO: 9)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAdCdCfUmGfCmG-3T
- ARC297 (SEQ ID NO: 10)
55 mCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAdCdCfUmGmCmG-3T
- ARC331 (SEQ ID NO: 11)
dCmGdCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGdCmG
- 60 ARC332 (SEQ ID NO: 12)
dCmGfCfCGfGmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG
- ARC333 (SEQ ID NO: 13)
fCmGdCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUfUAfCfCfUmGfCmG
65
- ARC334 (SEQ ID NO: 14)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGdCmG

ARC411 (SEQ ID NO: 15)

fCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

5

ARC412 (SEQ ID NO: 16)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGmCmG

ARC413 (SEQ ID NO: 17)

10 mCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC414 (SEQ ID NO: 18)

mCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGmCmG

15 ARC415 (SEQ ID NO: 19)

fCmGfGdCGfGmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfGfUmGfCmG

ARC416 (SEQ ID NO: 20)

fCmGfCfCGdCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

20

ARC417 (SEQ ID NO: 21)

fCmGfCdCGdCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC418 (SEQ ID NO: 22)

25 fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGdCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC419 (SEQ ID NO: 23)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCTmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

30 ARC420 (SEQ ID NO: 24)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGdCTmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC421 (SEQ ID NO: 25)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCfmGmAmGTfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

35

ARC422 (SEQ ID NO: 26)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGiCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUTfUAfCfCfUmGfCmG

ARC423 (SEQ ID NO: 27)

40 fCmGfUfCGfUmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUTAfUfUfUmGfCmG

ARC424 (SEQ ID NO: 28)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCfmGmAmGTTAfCfCfUmGfCmG

45 ARC425 (SEQ ID NO: 29)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCTmGfCmG

ARC426 (SEQ ID NO: 30)

fCmGfCfCGfCmGmGmUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAdCdCfUmGfCmG

50

ARC427 (SEQ ID NO: 31)

fCmGfCmCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC428 (SEQ ID NO: 32)

55 fCmGfCfCGmCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC429 (SEQ ID NO: 33)

fCmGfCmCGmCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCPCfUmGfCmG

60 ARC430 (SEQ ID NO: 34)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGmCfUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC431 (SEQ ID NO: 35)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGfCmUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfJfUfUAfCfCfUmGfCm

65

ARC432 (SEQ ID NO: 36)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC433 (SEQ ID NO: 37)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCfmGmAmGmUfUfUAfCfCfUmGfCmG

5

ARC434 (SEQ ID NO: 38)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCfmGmAmGfUmUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC435 (SEQ ID NO: 39)

10 fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGniAmGTdCTmGmAmGfUfUmUAfCfCfUmGfCmG

ARC436 (SEQ ID NO: 40)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGmUmUmUAfCfCfUmGfCmG

15 ARC437 (SEQ ID NO: 41)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCmUmGfCmG

ARC438 (SEQ ID NO: 42)

fCmGfCfCdGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

20

ARC439 (SEQ ID NO: 43)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCdGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC440 (SEQ ID NO: 44)

25 fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUdAfCfCfUmGfCmG

ARC457 (SEQ ID NO: 45)

mGfCmGfUfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmAfCmGm C

30 ARC458 (SEQ ID NO: 46)

mGmGmGfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmCmCmC

ARC459 (SEQ ID NO: 47)

mGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGm C

35

ARC473 (SEQ ID NO: 48)

mGmGmAfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGfUfCfU-3T

40 ARC522 (SEQ ID NO: 49)

mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTfUfUAdCdCTmGfCmGmCmC

ARC523 (SEQ ID NO: 50)

45 mGmGmCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTAdCdCTmGdCmGmCmC

ARC524 (SEQ ID NO: 51)

50 mGmGmCmGdCdCGdCmGmGTdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTmAdCdCTmGdCmGmCmC

ARC525 (SEQ ID NO: 52)

mGmGmCmGdCdCGdCmGmGTdCmUmCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGmUmCmUmGmAmGTTTmAdCdCTmGdCmGmCmC

55

ARC532 (SEQ ID NO: 53)

Biotina-AGfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC543 (SEQ ID NO: 54)

60 mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGmCmC

ARC544 (SEQ ID NO: 55)

mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUmCmUmCmAmGmGmCGfCfUmGmAmGmUmCmUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGmCmC

65

ARC550 (SEQ ID NO: 56)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUmAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC551 (SEQ ID NO: 57)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfJfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

5

ARC552 (SEQ ID NO: 58)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCG:fCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGTfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC553 (SEQ ID NO: 59)

10 fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUmAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC554 (SEQ ID NO: 60)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGTfUfUmAfCfCfUmGfCmG-3T

15 ARC 657 (SEO ID NO: 61)

20kDaPEG-NH-

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmArnGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC 658 (SEQ ID NO: 62)

20 30kDaPEG-NH-

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC 672 (SEQ ID NO: 63)

NH2-fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

25

ARC706 (SEQ ID NO: 64)

10kDaPEG-NH-

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

30 ARC1537 (SEO ID NO: 65)

40kDaPEG-NH-

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC1730) (SEQ ID NO: 66)

35 PEG20K-NH-

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-NH-PEG20K

ARC1905 (SEO ID NO: 67)

40KPEG-NH--

40 fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCtUmGmAmGfUfCtUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

Donde el PEG ramificado de 40 kDa es 2.3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo

ARC243 (SEO ID NO: 68)

45 GGfCGAfUfUfCfUGGGAfCGGAfCfUfCGfCGAfUGfUGAGfCfCfCAGAfCGAfCfUfCGfCfC

ARC244 (SEQ ID NO: 69)

GGfCfUfUfCfUGAAGAfUfUAfUfUfUfCGfCGAfUGfUGAAfCfUfCfCAGAfCfCfCfC

50 **[00134]** Otros aptámeros que se unen a la proteína del complemento C5 se describen a continuación en el Ejemplo 3.

[00135] En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos a base de aptámero de la presente memoria tienen una gran afinidad y especificidad por sus dianas, al mismo tiempo que reducen los efectos secundarios dañinos de las sustituciones de nucleótidos no naturales, si los agentes terapéuticos a base de aptámero se degradan en el cuerpo de los pacientes o sujetos. En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas que contienen los agentes terapéuticos a base de aptámero de la presente memoria están libres de, o tienen una cantidad reducida de nucleótidos fluorados.

60 **[00136]** Los aptámeros de la presente memoria pueden sintetizarse usando cualquier técnica de síntesis de oligonucleótidos conocida en la técnica, incluyendo las técnicas de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, Froehler y col., Nucl. Acid Res. 14: 5399-5467 (1986) y Froehler y col., Tet. Lett. 27: 5575-5578 (1986)), y procedimientos de fase en solución, tales como procedimientos de síntesis de triéster (véase, por ejemplo, Sood y col., Nucl. Acid Res. 4: 2557 (1977) y Hirose y col., Tet. Lett. 28: 2449 (1978)).

65

Composiciones Farmacéuticas

[00137] La invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen moléculas de aptámero que se unen a la proteína del complemento C5. En algunas realizaciones, las composiciones son adecuadas para uso interno e incluyen una cantidad eficaz de un compuesto farmacológicamente activo de la divulgación, solo o en combinación, con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos son especialmente útiles porque tienen toxicidad muy baja, si la tienen.

[00138] 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 los trastornos cardíacos relacionados con el complemento (por ejemplo, lesión de miocardio; complicaciones del complemento mediadas por C5 que se relacionan con la cirugía de revascularización coronaria (CABG), tales como sangrado postoperatorio, activación sistémica de los neutrófilos y leucocitos, aumento del riesgo de infarto de miocardio y aumento de la disfunción cognitiva; restenosis; y complicaciones mediadas por C5 que se relacionan con una intervención coronaria percutánea); lesión por isquemia/reperfusión (por ejemplo, infarto de miocardio, ictus, quemadura por frío); trastornos inflamatorios relacionados con el complemento (por ejemplo, asma, artritis, sepsis y rechazo después de trasplante de órganos); y trastornos autoinmunes relacionados con el complemento (por ejemplo, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico (LES o lupus); inflamación del pulmón; activación del complemento extracorpóreo; activación del complemento mediada por el anticuerpo; e indicaciones oculares, tales como retinopatía diabética. Las composiciones de la invención son útiles para su administración a un sujeto que padece, o tiene predisposición a, una enfermedad o trastorno que está relacionado con o derivado de la proteína del complemento C5 a la que los aptámeros de la invención se unen específicamente.

[00139] Las composiciones de la invención pueden usarse en un procedimiento para tratar un paciente o sujeto que tiene una patología. Los procedimientos de la presente memoria implican administrar al paciente o sujeto un aptámero o una composición que comprende aptámeros que se unen a una proteína del complemento C5, de forma que la unión del aptámero a la proteína del complemento C5 altera su función biológica de la diana, tratándose así la patología.

[00140] El paciente o sujeto que tiene una patología, es decir, el paciente o sujeto tratado mediante los procedimientos de la presente memoria, puede ser un vertebrado, más particularmente un mamífero, o más particularmente un ser humano.

[00141] 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 a su receptor, impidiendo la escisión de una proteína diana.

[00142] Un aspecto de la divulgación 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 junto con otra composición útil, tal como un agente antiinflamatorio, un inmunodepresor, un agente antivírico o similares. Además, los compuestos de la divulgación 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, serán adecuadas las formas de dosificación actualmente disponibles de los agentes terapéuticos conocidos para su uso en dichas combinaciones.

[00143] "Terapia de combinación" (o "co-terapia") incluye la administración de una composición de aptámero de la invención y al menos un segundo agente como parte de una pauta de tratamiento específica prevista para proporcionar el efecto beneficioso de la co-acción de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero sin limitación, la co-acción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación normalmente se realiza durante un periodo de tiempo definido (normalmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada).

[00144] La "terapia de combinación" puede pretender incluir, pero generalmente no, la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de pautas de monoterapia separadas que casual y arbitrariamente dan lugar a las combinaciones de la presente memoria. "Terapia de combinación" pretende incluir 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, en un modo sustancialmente simultáneo. La administración sustancialmente simultánea puede realizarse, por ejemplo, administrando al sujeto una única cápsula que tiene una proparte fija de cada agente terapéutico o en cápsulas individuales múltiples para cada uno de los agentes terapéuticos.

[00145] La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico puede efectuarse por cualquier vía apropiada que incluye, pero sin limitación, vía tópica, vía oral, vía intravenosa, vía intramuscular y

la absorción directa a través de los 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.

5

[00146] 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 los agentes terapéuticos se administran no es exhaustivamente crítica, a menos que se indique otra cosa. La "terapia de combinación" también puede incluir 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 sin fármaco, el tratamiento sin fármaco puede realizarse en cualquier momento adecuado, mientras que se logre un efecto beneficioso de la co-acción de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento sin fármaco. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso todavía se logra cuando el tratamiento de no fármaco se elimina temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás por días o incluso 15 semanas.

[00147] Las composiciones terapéuticas o farmacológicas de la presente invención comprenderán generalmente una cantidad eficaz del (de los) componente(s) activo(s) de la terapia, disuelto(s) o disperso(s) en un medio farmacéuticamente aceptable. Los medios o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de 20 disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas se conoce bien en la técnica. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones terapéuticas de la presente invención.

[00148] La preparación de composiciones farmacéuticas o farmacológicas se conocerá por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Normalmente, dichas composiciones pueden prepararse como inyectables, tanto como soluciones líquidas como suspensiones; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección; como comprimidos u otros sólidos para su administración por vía oral; como cápsulas de liberación controlada; o en cualquier otra forma actualmente usada, incluyendo colirios, cremas, 30 lociones, bálsamos, inhalantes y similares. El uso de formulaciones estériles, tales como lavados a base de solución salina, también puede ser particularmente útil por cirujanos, médicos o trabajadores sanitarios para tratar un área particular en el campo de operación. Las composiciones también pueden administrarse por un microdispositivo, micropartícula o esponja.

[00149] Tras la formulación, los agentes terapéuticos se administrarán de un modo compatible con la forma de dosificación, y en cantidad tal que sea farmacológicamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables que se han descrito anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

[00150] En este contexto, la cantidad de principio activo y volumen de composición que va a administrarse depende del animal huésped que va a tratarse. Las cantidades precisas de compuesto activo requeridas para la administración dependen del criterio del médico y son características para cada individuo.

[00151] Normalmente se utiliza un volumen mínimo de una composición requerida para dispersar los compuestos 45 activos. También son variables los regímenes adecuados para la administración, pero se tipificarían por la administración inicial del compuesto y supervisando los resultados y después administrando adicionalmente dosis controladas a intervalos adicionales.

[00152] Por ejemplo, para la administración por vía oral en forma de un comprimido o cápsula (por ejemplo, una 50 cápsula de gelatina), el componente de fármaco activo puede combinarse con un vehículo inerte oral no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados a la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona, azúcares naturales, tales como 55 glucosa o betalactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, 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 de calcio y/o polietilenglicol y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, almidones de goma xantano, agar, ácido algínico o su sal sódica, 60 o mezclas efervescentes y similares. Los diluyentes, incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

[00153] Las composiciones inyectables son preferiblemente soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones pueden 65 esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de la solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también

pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan según procedimientos de mezcla, granulación o recubrimiento convencionales, respectivamente, y típicamente contienen aproximadamente del 0,1 al 75%, preferiblemente aproximadamente del 1 a 50%, del principio activo.

5 **[00154]** Los compuestos de la divulgación también pueden administrarse en dichas formas de dosificación orales como comprimidos o cápsulas de liberación controlada y de liberación sostenida, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones.

10 **[00155]** Las composiciones líquidas, particularmente inyectables, pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, dispersando, 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 así formar la solución o suspensión inyectable. Adicionalmente, pueden formularse formas sólidas adecuadas para disolver en líquido antes de la inyección.

15 **[00156]** Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en forma intravenosa (tanto en bolo como infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular usando todas formas bien conocidas por los expertos en las técnicas farmacéuticas. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, tanto como soluciones líquidas como suspensiones.

20 **[00157]** La administración de inyectables parenterales se usa generalmente para inyecciones e infusiones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Adicionalmente, un enfoque para la administración parenteral emplea la implantación de sistemas de liberación lenta o de liberación sostenida, que aseguran que se mantiene un nivel constante de dosificación, según la patente de Estados Unidos N° 3.710.795.

25 **[00158]** Además, los compuestos preferidos para la presente invención pueden administrarse en forma intranasal por uso tópico de vehículos intranasales adecuados, o por vías transdérmicas, usando aquellas formas de parches transdérmicos para la piel bien conocidos por los expertos en la técnica. Para administrarse en forma de un sistema de administración transdérmica, la administración de dosificación será, por supuesto, continua en vez de intermitente durante toda la pauta de dosificación. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, pomadas, lociones, pulverizadores de aerosol y geles, en los que la concentración de principio activo variará típicamente del 0,01% al 15%, p/p o p/v.

30 **[00159]** Para composiciones sólidas pueden usarse excipientes que incluyen calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. El compuesto activo que se ha definido anteriormente también puede formularse en forma de supositorios usando, por ejemplo, polialquilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol, como vehículo. En algunas realizaciones, los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

40 **[00160]** Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de administración de liposomas, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas pueden formarse a partir de una diversidad de fosfolípidos que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, una película de componentes lipídicos se hidrata 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 no inmunogénico de alto peso molecular construido usando procedimientos conocidos en la técnica. Un ejemplo de complejos asociados a ácidos nucleicos se proporciona en la patente de Estados Unidos N° 6.011.020.

50 **[00161]** Los compuestos de la presente invención también pueden acoplarse a polímeros solubles como vehículos de fármaco que pueden elegirse como diana. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polihidroxietilspanamidafenol o poli(óxido de etileno)polilisina sustituido con residuos de palmitoilo. Además, los compuestos de la presente invención pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles en conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliepsilon-caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, 55 policianoacrilatos y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

[00162] Si se desea, la composición farmacéutica que va a administrarse también puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y otras sustancias, tales como, por ejemplo, acetato sódico y oleato de trietanolamina.

60 **[00163]** La pauta de dosificación que utiliza los aptámeros se selecciona según una diversidad de factores que incluyen tipo, especie, edad, peso, sexo y afección médica del paciente; la gravedad de la afección que va a tratarse; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el aptámero particular o sal del mismo empleado. Un médico o veterinario generalmente experto puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz 65 del fármaco requerida para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

[00164] Las dosificaciones orales de la presente memoria, cuando se usan para los efectos indicados, variarán entre aproximadamente 0,05 y 7500 mg/día por vía oral. Las composiciones se proporcionan preferiblemente 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.

[00165] 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.

[00166] Los niveles en 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 agentes terapéuticos a base de aptámero

[00167] Es importante que las propiedades farmacocinéticas para todos los agentes terapéuticos basados en oligonucleótidos, que incluyen aptámeros, se confeccionen para coincidir con la aplicación farmacéutica deseada. Mientras que los aptámeros dirigidos contra dianas extracelulares no padecen las dificultades asociadas a la administración intracelular (como es el caso con agentes terapéuticos antisentido y basados en ARNi), tales aptámeros todavía deben poder distribuirse a órganos y tejidos diana, y permanecer en el cuerpo (sin modificar) durante un periodo de tiempo de acuerdo con la pauta de dosificación deseada.

[00168] Por tanto, la presente memoria proporciona materiales y procedimientos para afectar la farmacocinética de composiciones de aptámero y, en particular, la capacidad para ajustar la farmacocinética de aptámeros. La capacidad para ajustar (es decir, la capacidad para modular) la farmacocinética de aptámeros se consigue mediante la conjugación de restos modificadores (por ejemplo, polímeros de PEG) con el aptámero y/o la incorporación de nucleótidos modificados (por ejemplo, 2'-flúor o 2'-OMe) para alterar la composición química del ácido nucleico. La capacidad para ajustar la farmacocinética de aptámeros 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 el contexto antineoplásico o agudo en el que puede desearse una rápida eliminación o salida del fármaco, se desea disminuir los tiempos de residencia de los aptámeros en la circulación. Como alternativa, en otras aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, terapias de mantenimiento en las que se desea la circulación sistémica de un agente terapéutico, puede desearse aumentar los tiempos de residencia de aptámeros en la circulación.

[00169] Además, la capacidad para ajustar la farmacocinética de aptámeros se usa para modificar la biodistribución de un agente terapéutico de aptámero en un sujeto. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas puede desearse alterar la biodistribución de un agente terapéutico de aptámero en un esfuerzo por elegir como diana un tipo particular de tejido o un órgano específico (o conjunto de órganos). En estas aplicaciones, el agente terapéutico de aptámero se acumula preferencialmente en un tejido u órgano(s) específico(s). En otras aplicaciones terapéuticas puede desearse elegir como diana tejidos que muestran un marcador celular o un síntoma asociado a una enfermedad, lesión celular u otra patología anormal, de forma que el agente terapéutico de aptámero se acumule preferencialmente en el tejido afectado. Por ejemplo, como se describe en la solicitud provisional relacionada de Estados Unidos N° de Serie 60/550790, presentada el 5 de marzo de 2004 y titulada "Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics", la PEGilación de un agente terapéutico de aptámero (por ejemplo, PEGilación con un polímero de PEG de 20 kDa) se usa para elegir como diana tejidos inflamados, de forma que el agente terapéutico de aptámero PEGilado se acumula preferencialmente en tejido inflamado.

[00170] Para determinar los perfiles farmacocinéticos y de biodistribución de agentes terapéuticos de aptámero (por ejemplo, conjugados de aptámeros o aptámeros que tienen químicas alteradas, tales como nucleótidos modificados), se controlan una diversidad de parámetros. Dichos parámetros incluyen, por ejemplo, la semivida ($t_{1/2}$), la eliminación del plasma (Cl), el volumen de distribución (V_{ss}), el área bajo la curva de concentración-tiempo (ABC), concentración en suero o en plasma observada máxima ($C_{máx}$) y el tiempo de residencia promedio (MRT) de una composición de aptámero. Como se usa en el presente documento, el término "ABC" se refiere al área bajo la representación de la concentración en plasma de un agente terapéutico de aptámero frente al tiempo después de la administración del aptámero. El valor del ABC se usa para estimar la biodisponibilidad (es decir, el porcentaje de agente terapéutico de aptámero administrado en la circulación después de la administración del aptámero) y/o eliminación total (Cl) (es decir, la velocidad a la que el agente terapéutico de aptámero se elimina de la circulación) de un agente terapéutico de aptámero dado. El volumen de distribución se refiere a la concentración en plasma de un agente terapéutico de aptámero con respecto a la cantidad de aptámero presente en el cuerpo. Cuanto mayor sea el V_{ss} , más aptámero se encuentra fuera del plasma (es decir, más extravasación).

[00171] La presente memoria proporciona materiales y procedimientos 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 una molécula pequeña, péptido o grupo terminal de polímero, o incorporando nucleótidos modificados en un aptámero. Como se describe en el presente documento, la conjugación de una

composición química de un resto modificador y/o nucleótido(s) de alteración altera aspectos fundamentales del tiempo de residencia de los aptámeros en circulación y la distribución a los tejidos.

[00172] Además de la eliminación por nucleasas, los agentes terapéuticos de oligonucleótidos están sometidos a
 5 eliminación por filtración renal. Como tal, un oligonucleótido resistente a nucleasas administrado por vía intravenosa presenta normalmente un semivida *in vivo* de <10 min, a menos que pueda bloquearse la filtración. Esto puede realizarse tanto facilitando la rápida distribución fuera de la corriente sanguínea en tejidos como aumentando el peso molecular aparente del oligonucleótido por encima del corte de tamaño eficaz para el glomérulo. La conjugación de
 10 agentes terapéuticos pequeños con un polímero de PEG (PEGilación), descrito más adelante, puede alargar espectacularmente los tiempos de residencia de aptámeros en circulación, disminuyendo así la frecuencia de dosificación y potenciando la eficacia contra dianas vasculares.

[00173] Los aptámeros pueden conjugarse con una diversidad de restos modificadores, tales como polímeros de alto peso molecular, por ejemplo, PEG; péptidos, por ejemplo, Tat (un fragmento de 13 aminoácidos de la proteína
 15 Tat del VIH (Vives y col., (1997), J. Biol. Chem. 272(25): 16010-7)), Ant (una secuencia de 16 aminoácidos derivada de la tercera hélice de la proteína homeótica de *Drosophila antennapedia* (Pietersz y col., (2001), Vaccine 19(11-12): 1397-405)) y Arg₇ (un péptido corto cargado positivamente que permea células compuesto por poliarginina (Arg₇) (Rothbard y col., (2000), Nat. Med. 6(11): 1253-7; Rothbard, J y col., (2002), J. Med. Chem. 45(17): 3612-8)); y moléculas pequeñas, por ejemplo, compuestos lipófilos, tales como colesterol. Entre los diversos conjugados
 20 descritos en el presente documento, las propiedades de aptámeros *in vivo* son las que se alteran más profundamente por complejación con grupos PEG. Por ejemplo, la complejación de un agente terapéutico de aptámero modificado con 2'F y 2'-OMe mixto con un polímero de PEG de 20 kDa dificulta la filtración renal y promueve la distribución de aptámeros a tanto tejidos sanos como inflamados. Además, el conjugado de polímero de PEG de 20 kDa-aptámero demuestra ser casi tan eficaz como un polímero de PEG de 40 kDa en la prevención de la
 25 filtración renal de aptámeros. Mientras que un efecto de PEGilación está en la eliminación de aptámeros, la exposición sistémica prolongada proporcionada por la presencia del resto de 20 kDa también facilita la distribución de aptámero a tejidos, particularmente aquellos de órganos altamente perfundidos y aquellos en el sitio de inflamación. El conjugado de aptámero-polímero de PEG de 20 kDa dirige la distribución de aptámeros al sitio de inflamación, de forma que el aptámero PEGilado se acumula preferencialmente en tejido inflamado. En algunos
 30 casos, el conjugado de aptámero PEGilado con 20 kDa puede acceder al interior de las células tales como, por ejemplo, células de riñón.

[00174] En general, los efectos en la farmacocinética y distribución en el tejido del aptámero, producidos por restos modificantes de bajo peso molecular, incluyendo el colesterol y los péptidos que permean las células, son
 35 típicamente menos pronunciados que los producidos como resultado de la PEGilación o modificación de los nucleótidos (por ejemplo, una composición química alterada). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se sugiere que las asociaciones mediadas por el colesterol con las lipoproteínas del plasma, postuladas para ocurrir en el caso del conjugado antisentido, están excluidas en el contexto particular de la estructura plegada del conjugado aptámero-colesterol y/o se relacionan con el aspecto de la naturaleza lipófila del grupo colesterol. Al igual que el
 40 colesterol, la presencia de una etiqueta de péptido Tat fomenta la eliminación del aptámero del torrente sanguíneo, con niveles comparativamente altos de conjugado que aparecen en los riñones a las 48 horas. Otros péptidos (por ejemplo, Ant, Arg₇) que se han indicado en la técnica para mediar el paso de las macromoléculas a través de las membranas celulares *in vitro*, no parecen promover la eliminación del aptámero de la circulación. Sin embargo, al igual que Tat, el conjugado Ant se acumula significativamente en los riñones con relación a otros aptámeros. Sin
 45 desear quedar ligado a teoría alguna, es posible que una presentación desfavorable de los restos modificantes del péptido Ant y Arg₇ en el contexto de aptámeros plegados tridimensionalmente *in vivo* disminuya la capacidad de estos péptidos de influenciar las propiedades de transporte del aptámero.

[00175] Los nucleótidos modificados también pueden usarse para modular la eliminación de aptámeros del plasma.
 50 Por ejemplo, un aptámero sin conjugar que incorpora químicas estabilizantes tanto de 2'-F como de 2'-OMe, que son típicas de aptámeros de la generación actual, ya que presenta un alto grado de estabilidad a nucleasas *in vitro* e *in vivo*, muestra una rápida pérdida del plasma (es decir, rápida eliminación del plasma) y una rápida distribución en tejidos, principalmente en el riñón, cuando se compara con el aptámero sin modificar.

55 Ácidos nucleicos derivatizados con PEG

[00176] Como se ha descrito anteriormente, la derivatización de ácidos nucleicos con polímeros no inmunogénicos de alto peso molecular tiene la posibilidad de alterar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de ácidos nucleicos haciendo que sean agentes terapéuticos más eficaces. Cambios favorables en la actividad pueden incluir
 60 disminución de la resistencia a la degradación por nucleasas, disminución de la filtración por los riñones, disminución de la exposición al sistema inmunitario y distribución alterada del agente terapéutico por el cuerpo.

[00177] Las composiciones de aptámero de la invención pueden derivatizarse con restos de polialquilenglicol ("PAG"). Se encuentran ejemplos de ácidos nucleicos derivatizados por PAG en la solicitud de patente de Estados
 65 Unidos N° de serie 10/718.833, presentada el 21 de noviembre de 2003. Los polímeros típicos usados en la presente memoria incluyen poli(etilenglicol) ("PEG"), también conocido como poli(óxido de etileno) ("PEO") y polipropilenglicol

(incluyendo poliisopropilenglicol). Adicionalmente, en muchas aplicaciones pueden usarse copolímeros al azar o de bloques de diferentes óxidos de alquileo (por ejemplo, óxido de etileno y óxido de propileno). En su forma más común, un polialquilenglicol, tal como PEG, es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos hidroxilo: $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$. Este polímero, alfa-, omega-dihidroxipoli(etilenglicol), también puede representarse como HO-PEG-OH, en la que se entiende que el símbolo -PEG- representa la siguiente unidad estructural: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, en la que n varía normalmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 10.000.

[00178] Como se muestra, la molécula de PEG es di-funcional y algunas veces se denomina "PEG diol". Las porciones 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 a otros compuestos en sitios reactivos en el compuesto. Tales 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 la reacción selectiva con restos amino por sustitución de los restos hidroxilo relativamente no reactivos, -OH, con restos éster activo de succinimidilo de N-hidroxi succinimida.

[00179] En muchas aplicaciones se desea proteger la molécula de PEG en un extremo con un resto esencialmente no reactivo de manera que la molécula de PEG sea mono-funcional (o mono-activada). En el caso de agentes terapéuticos de proteína que generalmente muestran múltiples sitios de reacción para PEG activados, los PEG activados bi-funcionales conducen a una amplia reticulación, dando agregados escasamente funcionales. Para generar PEG mono-activados, un resto hidroxilo en el extremo de la molécula de PEG-diol normalmente está sustituido con un resto del extremo metoxi no reactivo, $-\text{OCH}_3$. El otro extremo sin proteger de la molécula de PEG normalmente se convierte en un resto del extremo reactivo que puede activarse para la unión a un sitio reactivo sobre una superficie o una molécula, tal como una proteína.

[00180] Los PAG son polímeros que normalmente tienen propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos, carecen de toxicidad y carecen de inmunogenicidad. Un uso de PAG es para unir covalentemente el polímero a moléculas insolubles para hacer soluble el "conjugado" de PAG-molécula resultante. Por ejemplo, se ha mostrado que el fármaco insoluble en agua paclitaxel, cuando se acopla a PEG, se vuelve soluble en agua. Greenwald y col., J. Org. Chem., 60: 331-336 (1995). Los conjugados de PAG se usan frecuentemente no sólo para potenciar la solubilidad y estabilidad, sino también para prolongar la semivida en la circulación de la sangre de las moléculas.

[00181] Los compuestos polialquilados de la presente memoria tienen normalmente entre 5 y 80 kDa de tamaño; sin embargo, puede usarse cualquier tamaño, dependiendo la elección del aptámero y la aplicación. Otros compuestos de PAG de la presente memoria tienen entre 10 y 80 kDa de tamaño. Otros compuestos de PAG de la presente descripción tienen entre 10 y 60 kDa de tamaño. Por ejemplo, un polímero de PAG puede tener al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 u 80 kDa de tamaño. Dichos polímeros pueden ser lineales o ramificados.

[00182] A diferencia de los agentes terapéuticos de proteína biológicamente expresados, los agentes terapéuticos de ácido nucleico se sintetizan normalmente químicamente a partir de nucleótidos de monómeros activados. Los conjugados de PEG-ácido nucleico pueden prepararse incorporando el PEG usando la misma síntesis iterativa de monómeros. Por ejemplo, los PEG activados por conversión a una forma de fosoramidita pueden incorporarse en la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. Como alternativa, la síntesis de oligonucleótido puede completarse con incorporación específica para sitio de un sitio de unión a PEG reactivo. Más comúnmente, esto se ha realizado mediante la adición de una amina primaria libre al extremo 5' (incorporada usando una fosoramidita modificadora en la última etapa de acoplamiento de la síntesis en fase sólida). Usando esta estrategia, un PEG reactivo (por ejemplo, uno que se activa de manera que reaccionará y formará un enlace con una amina) se combina con el oligonucleótido purificado y la reacción de acoplamiento se realiza en solución. En algunas realizaciones, los polímeros son moléculas de PEG ramificado. En aún otras realizaciones, los polímeros son PEG ramificado de 40 kDa, véase, por ejemplo, (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida) representada en la figura 4. En algunas realizaciones, el PEG ramificado de 40 kD (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida) se une al extremo 5' del aptámero como se representa en la figura 5.

[00183] La capacidad de conjugación de PEG para alterar la biodistribución de un agente terapéutico está relacionada con varios factores que incluyen el tamaño aparente (por ejemplo, como se mide en términos de radio hidrodinámico) del conjugado. Se sabe que conjugados más grandes (>10 kDa) bloquean más eficazmente la filtración por el riñón y, por consiguiente, aumentan 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 vez de la eliminación por los riñones).

[00184] La producción de PEG de alto peso molecular (>10 kDa) puede ser difícil, ineficiente y cara. Como una vía hacia la síntesis de conjugados de PEG de alto peso molecular-ácido nucleico, el trabajo previo se ha basado en la generación de PEG activados de mayor peso molecular. Un procedimiento para generar tales moléculas implica la

formación de un PEG activado ramificado en el que dos o más PEG están unidos a un núcleo central que lleva el grupo activado. Las porciones terminales de estas moléculas de PEG de mayor peso molecular, es decir, los restos hidroxilo (-OH) relativamente no reactivos, pueden activarse, o convertirse en restos funcionales, para la unión de uno o más de los PEG a otros compuestos en sitios reactivos en el compuesto. Los PEG activados ramificados
 5 tendrán más de dos extremos, y en los 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 multi-activados. En algunos casos, no se activan todos los extremos en una molécula de PEG ramificada. En los casos en los que se activan dos extremos cualesquiera de una molécula de PEG ramificada, dichas moléculas de PEG se denominan PEG bi-activados. En algunos casos en los que sólo se activa un extremo en una molécula de PEG ramificada,
 10 dichas moléculas de PEG se denominan como mono-activadas. Como un ejemplo de este enfoque se ha descrito el PEG activado preparado por la unión de dos monometoxi-PEG a un núcleo de lisina que posteriormente se activa para la reacción (Harris y col., Nature, vol. 2: 214-221, 2003).

[00185] La presente memoria proporciona otra ruta rentable para la síntesis de conjugados de PEG de alto peso molecular-ácido nucleico (preferiblemente aptámero) que incluyen ácidos nucleicos multi-PEGilados. La presente memoria también comprende oligonucleótidos multiméricos ligados a PEG, por ejemplo, aptámeros dimerizados. La presente memoria también se refiere a composiciones de alto peso molecular en las que un resto estabilizador de PEG es un enlazador que separa diferentes partes de un aptámero, por ejemplo, el PEG está conjugado dentro de una única secuencia del aptámero, de forma que la disposición lineal de la composición de alto peso molecular del
 20 aptámero es, por ejemplo, ácido nucleico - PEG - ácido nucleico (-PEG - ácido nucleico)_n, en la que n es mayor o igual a 1.

[00186] Las composiciones de alto peso molecular de la presente memoria incluyen aquellas que tienen un peso molecular de al menos 10 kDa. Las composiciones tienen normalmente un peso molecular entre 10 y 80 kDa de tamaño. Las composiciones de alto peso molecular tienen al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 u 80 kDa de tamaño.

[00187] Un resto estabilizante 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 presente memoria. En algunos casos, un resto estabilizante es una molécula o parte de una molécula que lleva dos o más
 30 aptámeros, o dominios de aptámero, en proximidad, o proporciona una disminución de la libertad rotacional global de las composiciones de aptámero de alto peso molecular de la presente memoria. Un resto estabilizante puede ser un polialquilenglicol, tal como un polietilenglicol, que puede ser lineal o ramificado, un homopolímero o un heteropolímero. Otros restos estabilizantes incluyen polímeros tales como ácidos nucleicos de péptidos (PNA). Los oligonucleótidos también pueden ser restos estabilizantes; dichos oligonucleótidos pueden incluir nucleótidos
 35 modificados y/o enlaces modificados, tales como fosforotioatos. Un resto estabilizante puede ser una parte integral de una composición de aptámero, es decir, está covalentemente unido al aptámero.

[00188] Las composiciones de la presente memoria incluyen composiciones de aptámero de alto peso molecular en las que dos o más restos de ácido nucleico están covalentemente conjugados con al menos un resto de polialquilenglicol. Los restos de polialquilenglicol sirven de restos estabilizantes. En composiciones en las que un resto de polialquilenglicol está covalentemente unido en cualquier extremo con un aptámero, de forma que el polialquilenglicol una los restos de ácido nucleico juntos en una molécula, se dice que el polialquilenglicol es un resto de enlace. En dichas composiciones, la estructura primaria de la molécula covalente incluye la disposición lineal ácido nucleico-PAG-ácido nucleico. Un ejemplo es una composición que tiene la estructura primaria ácido nucleico-
 40 PEG-ácido nucleico. Otro ejemplo es una disposición lineal de: ácido nucleico-PEG-ácido nucleico-PEG-ácido nucleico.

[00189] Para producir el conjugado de ácido nucleico-PEG-ácido nucleico, el ácido nucleico se sintetiza originalmente de forma que lleve un único sitio reactivo (por ejemplo, esté mono-activado). En una realización preferida, este sitio reactivo es un grupo amino introducido en el extremo 5' mediante adición de una fosforamidita modificada como la última etapa en la síntesis en fase sólida del oligonucleótido. Tras 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 oligonucleótido es 1 mM, y la solución reconstituida contiene tampón NaHCO₃ 200 mM, pH 8,3. La síntesis del conjugado se inicia por la adición
 55 lenta escalonada de PEG bi-funcional altamente purificado. En una realización preferida, el PEG-diol se activa en ambos extremos (bi-activado) por derivatización con propionato de succinimidilo. Tras la reacción, el conjugado de PEG-ácido nucleico se purifica por electroforesis en gel o cromatografía líquida para separar especies completamente conjugadas, parcialmente conjugadas y sin conjugar. Las moléculas de PAG múltiple concatenadas (por ejemplo, como copolímeros al azar o de bloque) o cadenas de PAG más pequeñas pueden ligarse para lograr
 60 diversas longitudes (o pesos moleculares). Los enlazadores de no PAG pueden usarse entre cadenas de PAG de longitudes variables.

[00190] Las modificaciones de nucleótidos modificados con 2'-OMe, 2'-flúor y otros, estabilizan el aptámero contra nucleasas y aumentan su semivida *in vivo*. La protección 3'-3'-dT también aumenta la resistencia a exonucleasas.
 65 Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.674.685; 5.668.264; 6.207.816; y 6.229.002.

Derivatización de PAG de un ácido nucleico reactivo

[00191] Los conjugados de PAG-ácido nucleico-PAG de alto peso molecular pueden prepararse haciendo reaccionar un PEG activado mono-funcional con un ácido nucleico que contiene más de un sitio reactivo. En una
 5 realización, el ácido nucleico es bi-reactivo, o bi-activado, y contiene dos sitios reactivos: un grupo amino en 5' y un grupo amino en 3' introducidos en el oligonucleótido por síntesis de fosforamidita convencional, por ejemplo: 3'-5'-di-PEGilación como se ilustra en la figura 6. En realizaciones alternativas, los sitios reactivos pueden introducirse 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 la unión de aminos primarios. En dichas realizaciones, el ácido nucleico puede tener varios
 10 sitios activados o reactivos y se dice que está múltiplemente activado. Tras la síntesis y la purificación, el oligonucleótido modificado se combina con el PEG mono-activado en condiciones que promueven la reacción selectiva con los sitios reactivos del oligonucleótido a la vez que minimizan la hidrólisis espontánea. En la realización preferida, el monometoxi-PEG se activa con propionato de succinimidilo y la reacción acoplada se lleva a cabo a pH 8,3. Para accionar la síntesis del PEG bi-sustituido se proporciona PEG en exceso estequiométrico con respecto al
 15 oligonucleótido. Tras la reacción, el conjugado de PEG-ácido nucleico se purifica por electroforesis en gel o cromatografía líquida para separar especies completamente conjugadas, parcialmente conjugadas y sin conjugar.

[00192] Los dominios de enlace también pueden tener uno o más restos de polialquilenglicol unidos a los mismos. Dichos PAG pueden ser de longitudes variables y pueden usarse en combinaciones apropiadas para lograr el peso
 20 molecular deseado de la composición.

[00193] El efecto de un enlazador particular puede influirse tanto por su composición química como por su longitud. Un enlazador que es demasiado largo, demasiado corto o forma interacciones estéricas e/o iónicas desfavorables con la diana excluirá la formación del complejo entre el aptámero y la diana. Un enlazador que es más largo de lo
 25 necesario para abarcar la distancia entre ácidos nucleicos puede reducir la estabilidad de unión disminuyendo la concentración eficaz del ligando. Por tanto, con frecuencia es necesario optimizar las composiciones y longitudes de enlazador con el fin de maximizar la afinidad de un aptámero a una diana.

EJEMPLO 1

30

Actividad del Aptámero Anti-C5 en las Vías del Complemento Clásica y Alternativa**Ejemplo 1A: Ensayo de hemólisis**

[00194] La prueba CH50 mide la capacidad del sistema del complemento en una muestra de prueba en suero para lisar el 50% de las células en una suspensión estandarizada de eritrocitos de oveja recubiertos con anticuerpo. Una
 35 solución de suero humano al 0,2% se mezcló con eritrocitos de oveja recubiertos con anticuerpo (Diamedix EZ Complement CH50 Kit, Diamedix Corp., Miami, FL), en presencia o ausencia de diversos aptámeros anti-C5. El ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo del kit en solución salina tamponada con veronal que contiene calcio, magnesio y gelatina al 1% (tampón del complemento GVB⁺⁺) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después de la
 40 incubación, las muestras se centrifugaron para granular los eritrocitos intactos. La densidad óptica a 412 nm (DO₄₁₂) del sobrenadante se leyó para cuantificar la liberación de hemoglobina soluble, que es proporcional al grado de hemólisis (Green y col., (1995) Chem. Biol. 2: 683-95). Para verificar que los aptámeros bloquearon la actividad de C5, algunos sobrenadantes de la hemólisis se analizaron para determinar la presencia de C5a y C5b-9 mediante
 45 ELISA (kit de ELISA para C5b-9, Quidel, San Diego, CA; kit de ELISA para C5a, BD Biosciences, San Diego, CA).

[00195] La adición de un aptámero anti-C5 no PEGilado (ARC186) (SEQ ID NO: 4) a la mezcla de reacción, inhibió la hemólisis de una manera dependiente de la dosis, como se muestra en la gráfica de la figura 7A, con una CI₅₀ de 0,5 ± 0,1 nM (véase la figura 7B), un valor de acuerdo con la K_D determinada mediante la filtración de nitrocelulosa.
 50 A concentraciones del aptámero muy altas (>10 nM), el grado de hemólisis fue básicamente indistinguible del fondo (sin suero agregado), indicando que ARC186 (SEQ ID NO: 4) fue capaz de bloquear completamente la actividad del complemento. La conjugación del aptámero ARC186 (SEQ ID NO: 4) con grupos PEG de 20 kDa (ARC657; SEQ ID NO: 61), 30 kDa (ARC658; SEQ ID NO: 62), (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida) de 40 kDa ramificados (ARC187; SEQ ID NO: 5), (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamilo) de 40 kDa ramificados (ARC1905; SEQ ID NO: 67), de 40 kDa lineales (ARC1537; SEQ ID NO: 65), y de 2 x 20 kDa lineales (ARC1730; SEQ ID NO: 66), tuvo
 55 poco efecto en la actividad inhibidora del aptámero (figura 7A-figura 7D). Finalmente, los análisis ELISA de los sobrenadantes de hemólisis indicaron que esta inhibición funcional se correlaciona con el bloqueo de la liberación de C5a. Así, los datos de la hemólisis muestran que ARC186 (SEQ ID NO: 4), y sus conjugados PEGilados, son inhibidores del complemento altamente potentes que funcionan bloqueando la activación catalizada por la convertasa de C5.
 60

[00196] Los ensayos de hemólisis con material no PEGilado indicaron que el aptámero anti-C5 no reacciona de manera cruzada con C5 de varias especies que no son primates, incluyendo rata, cobaya, perro y cerdo. Sin embargo, se observó una actividad inhibidora significativa en selecciones de suero de primate, incluyendo suero de
 65 macaco cynomolgus, macaco rhesus y chimpancé. La eficacia *in vitro* del aptámero anti-C5 se investigó adicionalmente en suero de mono cynomolgus usando ARC658 (SEQ ID NO: 62), el análogo de PEG de 30 kDa de

ARC186 (SEQ ID NO: 4). En una comparación lado a lado ($n = 3$), ARC658 inhibió la actividad del complemento humano con una CI_{50} de $0,21 \pm 0,0$ nM y la actividad del complemento de mono cynomolgus con una CI_{50} de $1,7 \pm 0,4$ nM (figura 8). Así, ARC658 (SEQ ID NO: 62) es 8 ± 3 veces menos potente en el suero de mono cynomolgus en comparación con el humano mediante esta medición.

5

[00197] Ensayos de Unión al Filtro de Nitrocelulosa. Los aptámeros individuales se marcaron con ^{32}P en el extremo 5' mediante incubación con γ - ^{32}P -ATP y polinucleótido cinasa (New England Biolabs, Beverly, MA). El aptámero radiomarcado se purificó para liberarlo del ATP mediante filtración en gel seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida. Para medir la afinidad del aptámero anti-C5, el aptámero radiomarcado (≤ 10 pM) se incubó con concentraciones en aumento (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 a 37 °C, durante intervalos de tiempo de 15 minutos y 4 horas. Las reacciones de unión se analizaron mediante filtración con nitrocelulosa usando un colector de filtración al vacío de 96 pocillos de transferencia puntual Minifold I (Schleicher & Schuell, Keene, NH). Se utilizó un medio de filtración de tres capas, que consistía (desde la parte superior a la inferior) en nitrocelulosa Protran (Schleicher & Schuell), nylon Hybond-P (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y papel para transferencia en gel GB002 (Schleicher & Schuell). La capa de nitrocelulosa, que une manera selectiva la proteína con respecto al ácido nucleico, retuvo de manera preferida el aptámero anti-C5 en complejo con un ligando de la proteína, mientras que el aptámero anti-C5 no complejo, pasó a través de la nitrocelulosa y se adhirió al nylon. El papel de transferencia en gel se incluyó simplemente como un medio de soporte para los demás filtros. Después de la filtración, las capas del filtro se separaron, se secaron y se expusieron a un tamiz de fósforo (Amersham Biosciences), y se cuantificaron utilizando un sistema de formación de imágenes por transferencia Storm 860 Phosphorimager® (Amersham Biosciences).

[00198] Como se muestra en la figura 9 y la figura 10, las concentraciones de C5 en aumento, mejoran la proporción de ARC186 capturada en la membrana de nitrocelulosa. La dependencia de ARC186 unido en las concentraciones de C5 en aumento se describe bien por un modelo de unión en un solo sitio ($C5 + ARC186 \leftrightarrow C5 \cdot ARC186$; % unido = $C_{m\acute{a}x}/(1 + K_D/[C5])$; $C_{m\acute{a}x}$ es el % unido máximo a $[C5]$ de saturación; K_D es la constante de disociación). Las curvas de unión de ARC186 a dos temperaturas después de una incubación de 15 minutos o 4 horas, se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente. Después de una incubación de 15 minutos, las curvas de unión de ARC186 a 23 °C y 37 °C, son básicamente indistinguibles dentro del error, ajustando con los valores de K_D de 0,5-0,6 nM (figura 9). Las diferencias entre las curvas de unión a 23 °C y 37 °C se vuelven más pronunciadas cuando el tiempo de incubación se extiende. Después de una incubación de 4 horas (figura 10), la K_D observada a 23 °C disminuye a $0,08 \pm 0,01$ nM, mientras que la K_D observada a 37 °C permanece inalterada ($0,6 \pm 0,1$ nM).

[00199] Para demostrar las bases de los requisitos de incubación largos a temperatura ambiente, la afinidad a esta temperatura se exploró adicionalmente usando métodos cinéticos. La velocidad de la reacción inversa que describe la disociación de $C5 \cdot ARC186$ es $v_{rev} = k_{-1}[C5 \cdot ARC186]$, donde v_{rev} es la velocidad (unidades de $M \min^{-1}$) y k_{-1} es la constante de la velocidad de disociación de primer orden (unidades de $\min^{-1}$). La velocidad de la reacción hacia delante que describe la formación del complejo $C5 \cdot ARC186$ es $v_{for} = k_1[C5][ARC186]$, donde v_{for} es la velocidad (unidades de $M \min^{-1}$) y k_1 es la constante de la velocidad de disociación de segundo orden (unidades de $M^{-1}\min^{-1}$). Los datos se analizaron usando la suposición de pseudoprimer orden, donde la concentración de un reactante ($C5$ en este caso), se mantiene en un gran exceso con respecto al otro ($[C5] \gg [ARC186]$, y, por lo tanto, permanece esencialmente sin cambios durante el transcurso de la reacción. En estas condiciones, la reacción hacia delante se describe por la ecuación de la velocidad para un proceso de primer orden, $v_{for} = k_1'[ARC186]$, donde $k_1' = k_1 [C5]$.

[00200] Para analizar la disociación de $C5 \cdot ARC186$, el ARC186 radiomarcado (≤ 10 pM), se equilibró previamente con proteína C5 5 nM en una solución salina tamponada con fosfato que contenía $MgCl_2$ 1 mM a temperatura ambiente (23 °C). La reacción de disociación se inició mediante la adición de ARC186 no marcado (1 μM), que actúa como una trampa para el C5 libre, y se detuvo mediante la filtración con nitrocelulosa, dividiendo el ARC186 radiomarcado unido y libre. Un curso cronológico de la disociación de ARC186 se obtuvo variando la duración entre el inicio de la reacción de disociación y la filtración. El curso cronológico de la disociación, observado como una disminución en el porcentaje de ARC186 radiomarcado, capturado en el filtro de nitrocelulosa (igual al porcentaje unido a C5), se describe bien por un decaimiento con un solo exponencial, donde el % de ARC186 unido = $100 \times e^{-k_{-1}t}$ (véase la figura 11). El valor de la constante de la velocidad de disociación, k_{-1} , determinado mediante este procedimiento, es $0,013 \pm 0,02 \min^{-1}$, que corresponde a una semivida ($t_{1/2} = \ln 2/k_{-1}$) de 53 ± 8 min.

[00201] Para analizar la reacción de asociación, la constante de la velocidad de equilibrio (K_{eq}) para la formación de $C5 \cdot ARC186$, se midió en presencia de concentraciones variables de la proteína C5 (1-5 nM). La formación del complejo se inició mezclando la proteína C5 y ARC186 radiomarcado en PBS que contenía $MgCl_2$ 1 mM a temperatura ambiente (23 °C), y se detuvo mediante la división por la filtración con nitrocelulosa. Como se describe para las reacciones de disociación, se obtuvo un curso cronológico de la formación del complejo variando la duración entre el inicio de la reacción y la filtración. El curso cronológico del equilibrio, observado como un aumento en el porcentaje de ARC186 radiomarcado capturado en el filtro de nitrocelulosa, se describe bien mediante un decaimiento con un solo exponencial, donde el % de ARC186 unido = $100 \times e^{-k_{-1}t}$. Los cursos cronológicos del

equilibrio para C5 1, 2 y 4 nM se muestran en la figura 12. Como se esperaba, el valor de k_{eq} aumenta linealmente con [C5] (k_{eq} (1 nM) = $0,19 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$; k_{eq} (2 nM) = $0,39 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$; k_{eq} (3 nM) = $0,59 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$; k_{eq} (4 nM) = $0,77 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$; k_{eq} (5 nM) = $0,88 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$). En las condiciones del experimento, la relación entre k_{eq} , k_1 y k_{-1} es $k_{eq} = k_1[C5] + k_{-1}$. Así, un cálculo de k_1 se deriva de la pendiente de una gráfica de k_{eq} frente a [C5] (véase el inserto de la figura 12), en este caso, $0,18 \pm 0,01 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}$.

[00202] Estos datos indican que, en las condiciones de baja concentración de C5 (por ejemplo, 0,1 nM), se requiere una incubación extensa con el fin de que la mezcla de C5 y ARC186 radiomarcado alcance el equilibrio. En estas condiciones, $k_{eq} = (0,18 \pm 0,01 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}) (0,1 \text{ nM}) + 0,013 \text{ min}^{-1} = 0,03 \text{ min}^{-1}$, que corresponde a una semivida de 22 minutos. Así, se requieren casi 2 horas de incubación a temperatura ambiente (-5 vidas medias), para terminar (>95%) el equilibrio. Un tiempo de incubación corto (por ejemplo, 15 minutos), subestimaría de manera significativa la afinidad real del complejo, como se ha mostrado anteriormente mediante la diferencia en las afinidades observadas para una incubación de 15 minutos ($K_D = 0,5 \text{ nM}$) frente a una incubación de 4 horas ($K_D = 0,08 \text{ nM}$). Un cálculo alternativo de la K_D a temperatura ambiente puede calcularse 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 $0,07 \pm 0,01 \text{ nM}$, que es completamente consistente con la K_D que se ha determinado anteriormente mediante los procedimientos termodinámicos.

[00203] La especificidad de ARC186 (SEQ ID NO: 4) para C5 también se valoró en los ensayos de filtración con nitrocelulosa mediante la comparación con los componentes del complemento tanto corriente arriba como corriente abajo de C5 en la cascada del complemento. Los resultados se representan en la figura 13. El aptámero básicamente no reconoce C5a ($K_D \gg 3 \mu\text{M}$), aunque muestra una afinidad débil para C5b-9 soluble ($K_D > 0,2 \mu\text{M}$), supuestamente debido a las interacciones con el componente de C5b. Otros componentes del complemento muestran una afinidad moderada a leve para el aptámero. C3 no activada esencialmente no se une al aptámero; sin embargo, el factor H ($K_D \sim 100 \text{ nM}$) y, a un grado mucho menor, C1q ($K_D > 0,3 \mu\text{M}$) sí se unen. Tomados juntos, los datos indican que ARC186 (SEQ ID NO: 4) se une con una alta afinidad a C5 humana, principalmente mediante el reconocimiento del dominio C5b.

[00204] Los aptámeros modificados con PEG no se evalúan fácilmente mediante los ensayos de filtración con nitrocelulosa debido a la tendencia de estos aptámeros a adherirse a la nitrocelulosa, incluso en ausencia de la proteína diana. Sin embargo, las afinidades relativas de estos aptámeros pueden evaluarse a partir de su capacidad comparativa para competir con el aptámero no PEGilado radiomarcado ($\leq 10 \text{ pM}$) para unirse a la diana. Según la concentración del competidor frío (es decir, no radiomarcado) aumenta, el porcentaje del aptámero radiomarcado unido a la proteína diana disminuye. Como se muestra en la figura 14, las concentraciones en aumento de ARC186 frío (SEQ ID NO: 4) o el aptámero PEGilado (ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62), y ARC187 (SEQ ID NO: 5)) ($0,05\text{-}1000 \text{ nM}$), compiten fácilmente con ARC186 radiomarcado (SEQ ID NO: 4) para la unión en presencia de la proteína C5 2 nM. Además, las curvas de titulación para los cuatro aptámeros casi se superponen, indicando que la conjugación de PEG tiene poco o ningún efecto en la afinidad del aptámero para C5.

Ejemplo 1B: Ensayo de Sangre Completa

[00205] El efecto del aptámero anti-C5 en la vía alternativa del sistema del complemento se analizó usando el siguiente ensayo de sangre completa. En ausencia de un anticoagulante, la sangre se extrajo de voluntarios humanos normales. Las alícuotas de sangre (que no contenían anticoagulante), se incubaron con concentraciones en aumento de ARC186 (SEQ ID NO: 4) durante 5 horas a temperatura ambiente o a 37°C . Las muestras se centrifugaron para aislar el suero, y la presencia de C5b en el suero se detectó mediante ELISA de sC5b-9 (kit ELISA para C5b-9, Quidel, San Diego, CA). Como se muestra en la figura 15, la actividad anticomplemento, como se refleja en la producción de C5b-9, entre las muestras incubadas a diferentes temperaturas, divergió a $3 \mu\text{M}$. Los datos de la temperatura ambiente indicaron que la concentración del aptámero requerida para la inhibición cuantitativa está en el intervalo de $3\text{-}6 \mu\text{M}$, mientras que la concentración indicada de C5 es de aproximadamente 400 nM . Estos resultados sugieren que puede requerirse de un exceso molar de 10 veces del aptámero anti-C5 (ARC186; SEQ ID NO: 4) para la inhibición completa de la actividad de C5.

Ejemplo 1C: Activación del Complemento mediante zymosan

[00206] El zymosan es un componente polisacárido de la pared de las células de levadura, y un potente activador de la cascada del complemento alternativa. La adición de zymosan a muestras de sangre, plasma o suero *ex vivo* da como resultado la acumulación de productos de activación del complemento, incluyendo C5a y la versión soluble de C5b-9 (sC5b-9). Se añadieron muestras del suero humano no diluido (Center for Blood Research, Boston, MA), sangre completa humana citrada (Center for Blood Research, Boston, MA) o suero de mono cynomolgus (Charles River Labs, Wilmington, MA) con concentraciones en aumento de ARC658 (SEQ ID NO: 62), el análogo de PEG de 30K de ARC186 (SEQ ID NO: 4). Para activar el complemento, se añadió zymosan (Sigma, St. Louis, MO) en una suspensión $10 \times$ a las muestras a una concentración final de 5 mg/ml . Después de una incubación de 15 minutos a 37°C , las partículas de zymosan se retiraron mediante centrifugación y el grado de la activación del complemento se determinó mediante ELISA de C5a y/o ELISA de sC5b-9 (kit ELISA de C5b-9, Quidel, San Diego, CA; kit ELISA de C5a, BD Biosciences, San Diego, CA).

[00207] En ausencia del aptámero, el tratamiento con zymosan activa ~50% de C5 en suero o sangre completa, en comparación con la activación de ~1% en la muestra no tratada. La adición del aptámero anti-C5 hasta 50 nM (~10% de la concentración de C5 en sangre), tuvo poco efecto en la formación de sC5b-9. Sin embargo, la titulación adicional de C5 con concentraciones en aumento de ARC658 (SEQ ID NO: 62), inhibió la activación de C5 de una manera dependiente de la dosis, como se observa en la figura 16. En suero o sangre completa humana, la inhibición cuantitativa (~99%) se observó en ARC658 (SEQ ID NO: 62) 0,8-1 μ M, que correspondía a ~2 equivalentes molares de aptámero para C5. Se necesitaron concentraciones más altas de aptámero para lograr una inhibición comparable en suero de mono cynomolgus. En este caso, se consiguió una inhibición del 99% únicamente en presencia de aptámero 10 μ M, o -20 equivalentes molares de aptámero para C5.

Ejemplo 1D: Modelo de bucle de tubos de la activación del complemento

[00208] Para probar la capacidad del aptámero anti-C5 de bloquear la activación del complemento inducida por la exposición a materiales extraños, como se encuentra en un circuito de derivación cardiopulmonar, se usó el modelo de bucle de tubos descrito por Nilsson y col. (Gong y col., (1996) Journal of Clinical Immunology 16, 222-9; Nilsson y col., (1998) Blood 92, 1661-7). Un entubado médico/quirúrgico Tygon S-50-HL (diámetro interno de 6,35 milímetros (1/4")) se cortó en tramos de aproximadamente 300 mm (aproximadamente un volumen de 9 ml), y se llenó con 5 ml de sangre de un donante humano que contenía 0,4 unidades/ml de heparina (Celsus) y concentraciones variables de ARC658 (SEQ ID NO: 62) (0-5 μ M). Cada tramo de tubo Tygon se cerró en un bucle con una pieza de entubado de silicona, como se describe en Gong y col. Los bucles de tubos se hicieron girar durante 1 hora a aproximadamente 30 rpm en un baño de agua a 37 °C. Después, el contenido del bucle se vertió en tubos cónicos de polipropileno que contenían EDTA (concentración final 10 mM) para interrumpir la activación del complemento. El plasma deficiente en plaquetas se aisló mediante centrifugación y se analizó para C5a y C3a mediante ELISA (kit ELISA para C3a, Quidel, San Diego, CA; kit ELISA para C5a, BD Biosciences, San Diego, CA).

[00209] La activación del complemento total en ausencia del aptámero fue pequeña en comparación con el ensayo con zymosan. Típicamente, los niveles de C5a aumentaron en aproximadamente 6 ng/ml después de 1 hora de incubación, lo que corresponde a una activación de <1% del C5 disponible. Sin embargo, este aumento fue reproducible y se inhibió mediante titulación con ARC658 (SEQ ID NO: 62). Como se muestra en la figura 17, el ARC658 (SEQ ID NO: 62) 300-400 nM fue suficiente para lograr el 99% de la inhibición de la activación de C5, un nivel que es aproximadamente equivalente o ligeramente menor que la concentración molar de C5 en sangre. Sin desear quedar ligando a teoría alguna, aunque se requiere menos aptámero para obtener el 99% de la inhibición de la activación de C5 en este modelo que en el modelo de zymosan, esta observación podría reflejar las diferencias sustanciales en los estímulos que activan el complemento utilizados en los dos ensayos. La generación de C3a también se supervisó como un control para verificar que ARC658 (SEQ ID NO: 62) no bloqueó las etapas de activación antes que C5 en la cascada del complemento. Los niveles de C3a aumentaron en aproximadamente 4000 ng/ml después de 1 hora de incubación, lo que corresponde a la activación de aproximadamente el 10% de C3 disponible. A diferencia de la generación de C5a, se observó poca inhibición dependiente de la dosis de la generación de C3a tras la titulación con ARC658 (SEQ ID NO: 62), demostrando que ARC658 (SEQ ID NO: 62) bloquea de manera específica la escisión de C5.

EJEMPLO 2

45 Selecciones y Secuencias De Novo

Selección de C5 con conjunto dRmY

[00210] Se realizaron dos selecciones para identificar los aptámeros dRmY para la proteína C5 de longitud completa humana. La proteína C5 (Quidel Corporation, San Diego, CA o Advanced Research Technologies, San Diego, CA), se usó en la forma de longitud completa ("FL") y parcialmente tripsinizada ("TP"), y ambas selecciones eran selecciones directas contra las dianas de la proteína que se habían inmovilizado en una placa hidrófoba. Ambas selecciones proporcionaron conjuntos significativamente enriquecidos para la unión de C5 de longitud completa frente al conjunto no seleccionada y no tratado. Todas las secuencias mostradas en este ejemplo, se muestran de 5' a 3'.

[00211] Preparación del Conjunto: Una plantilla de ADN con la secuencia TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAAACGTTCTACN₍₃₀₎GGTCGATCGATCGATCATCGATG (ARC520; SEQ ID NO: 70) se sintetizó usando un sintetizador de ADN ABI EXPEDITE™, y se desprotegió mediante procedimientos convencionales. Las plantillas se amplificaron con el cebador 5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAAACGTTCTAC (SEQ ID NO: 71) y el cebador 3' CATCGATGATCGATCGATCGACC (SEQ ID NO: 72), y después se usó en forma de una plantilla para la transcripción *in vitro* con la ARN polimerasa T7 mutante única Y639F. Las transcripciones se hicieron utilizando HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, Triton X-100 al 0,01%, PEG-8000 al 10%, MgCl₂ 9,5 mM, MnCl₂ 2,9 mM, NTP 2 mM, GMP 2 mM, espermina 2 mM, 0,01 unidades/ μ l de pirofosfatasa inorgánica, y la polimerasa T7 mutante única Y639F.

[00212] Selección: En la ronda 1, se realizó una etapa de selección positiva en columnas de unión al filtro de nitrocelulosa. En resumen, se incubaron 1×10^{15} moléculas (0,5 nmoles) del ARN del conjunto en 100 μ l de tampón de unión (DPBS 1 x) con C5 de longitud completa 3 μ M o C5 parcialmente tripsinizado 2,6 μ M durante 1 hora a temperatura ambiente. Los complejos de ARN:proteína y las moléculas de ARN libre se separaron utilizando columna giratorias de nitrocelulosa de 0,45 μ m de Schleicher & Schuell (Keene, NH). Las columnas se lavaron previamente con 1 ml de DPBS 1 x, y después las soluciones que contenían ARN:proteína, se añadieron a las columnas y se hicieron girar en una centrífuga a 1500 g durante 2 minutos. Se realizaron tres lavados con tampón de 1 ml para eliminar los aglutinantes no específicos de los filtros, después los complejos de ARN:proteína unidos a los filtros se eluyeron dos veces con 200 μ l de lavados 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 glucógeno, 1 volumen de isopropanol, 1/2 volumen de etanol). El ARN se transcribió de manera inversa con el sistema ThermoScript RT-PCR™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando el cebador 3' que se ha descrito anteriormente de SEQ ID NO: 72 seguido de la amplificación con PCR (Tris 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, cebadores SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 0,5 μ M, cada dNTP 0,5 mM, 0,05 unidades/ μ l de polimerasa Taq (New England Biolabs, Beverly, MA)). Las plantillas de PCR se purificaron usando columnas Centriprep (Princeton Separations, Princeton, NJ) y se usaron para transcribir el siguiente conjunto de la ronda.

[00213] En las rondas de selección posteriores, la separación del ARN unido y libre se hizo en placas hidrófobas Nunc Maxisorp (Nunc, Rochester, NY). La ronda se inició inmovilizando 20 pmoles de C5 de longitud completa y C5 parcialmente tripsinizado a la superficie de la placa durante 1 hora a temperatura ambiente en 100 μ l de DPBS 1 x. Después, el sobrenadante se eliminó, y los pocillos se lavaron 4 veces con 120 μ l de tampón de lavado (DPBS 1 x). Después, los pocillos de proteínas se bloquearon con un tampón de DPBS 1 x que contenía 0,1 mg/ml de ARNt de levadura y 0,1 mg/ml de ADN de esperma de salmón como competidores. La concentración del conjunto usada fue siempre al menos en un exceso de cinco veces de la concentración de la proteína. El ARN del conjunto también se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en pocillos vacíos para eliminar cualquier secuencia de unión a plástico, y después se incubaron en un pocillo bloqueado sin proteína para eliminar cualquier secuencia de unión al competidor del conjunto antes de la etapa de la selección positiva. Después, el ARN del conjunto se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y el ARN unido a C5 inmovilizado se transcribió de manera inversa directamente en la placa de selección mediante la adición de la mezcla RT (cebador 3', SEQ ID NO: 72 y Thermoscript RT, invitrogen), seguido de incubación a 65 °C durante 1 hora. El ADNc resultante se usó como una plantilla para PCR (polimerasa Taq, New England Biolabs). El ADN de la plantilla del conjunto amplificado se desaló con una columna Centriprep (Princeton Separations), de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante, y se usó para programar la transcripción del ARN del conjunto para la siguiente ronda de selección. El conjunto transcrito se purificó en gel en un gel de poli(acrilamida) al 10% cada ronda.

[00214] El progreso de la selección se controló usando un ensayo de unión al filtro emparejado (transferencia puntual). El ARN del conjunto marcado con 5'-³²P (concentración en trazas) se incubó con C5, DPBS 1 x más 0,1 mg/ml de ARNt y 0,1 mg/ml de ADN de esperma de salmón, durante 30 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se aplicó a un filtro intercalado de nitrocelulosa y nylon en un aparato de transferencia puntual (Schleicher y Schuell). El porcentaje de ARN del conjunto unido a la nitrocelulosa se calculó y se controló aproximadamente cada 3 rondas con un solo punto de selección (C5 +/- 300 nM). Las mediciones de la K_D del conjunto se midieron usando una titulación de la proteína y el aparato de transferencia puntual, como se ha descrito anteriormente.

[00215] Datos de selección: Ambas selecciones se enriquecieron después de 10 rondas sobre el conjunto sin tratar. Véase la figura 18. En la ronda 10, la K_d del conjunto fue de aproximadamente 115 nM para la selección de longitud completa y 150 nM para la tripsinizada, pero el grado de unión fue únicamente de aproximadamente el 10% en la plataforma de ambas. Los conjuntos R10 se clonaron usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) y se secuenciaron.

[00216] Información de la Secuencia: Se secuenciaron 45 clones de cada conjunto. El conjunto de longitud completa R10 estuvo dominado por un solo clon ARC913 (SEQ ID NO: 75), que constituyó el 24% del conjunto, 2 conjuntos de secuencias duplicadas y sencillas constituyeron el resto. La agrupación tripsinizada R10 contenía 8 copias de la misma secuencia ARC913 (SEQ ID NO: 75), pero el conjunto estuvo dominado por otra secuencia (AMX221.A7; 46%). El clon ARC913 (SEQ ID NO: 75) tenía una K_d de aproximadamente 140 nM, y el grado de unión fue del 20%. Véase la figura 19.

[00217] La secuencia individual enumerada en la Tabla 5 se enumera en la dirección 5' a 3', y representa la secuencia ribonucleotídica del aptámero que se seleccionó en las condiciones de SELEX™ de dRmY proporcionadas. En las realizaciones de la invención derivadas de esta selección (y como se refleja en la lista 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 o no contener protección (por ejemplo, dT 3'-invertido). La secuencia única del aptámero siguiente empieza en el nucleótido 23, siguiendo inmediatamente la secuencia fija GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEQ ID NO: 73), y transcurre hasta que se encuentra con la secuencia de ácidos nucleicos 3' fija

GGUCGAUCGAUCGAUCGAUCGAUG (SEQ ID NO: 74).

[00218] Tabla 5: Secuencia nucleotídica del aptámero dRmY de C5

5

ARC913 (SEQ ID NO: 75)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGAU
CGAUCGAUCGAUCGAUG

- 10 **[00219] Ensayo de hemólisis:** El efecto de ARC913 (SEQ ID NO: 75) en la vía clásica del sistema del complemento se analizó usando un ensayo de hemólisis que se ha descrito previamente, en comparación tanto con ARC186 (SEQ ID NO: 4) (aptámero anti-C5, control positivo) como el conjunto dRmY no seleccionado (control negativo). En el ensayo de la inhibición hemolítica, una solución de suero humano completo al 0,2% se mezcló con eritrocitos de oveja recubiertos con el anticuerpo (Prueba CH50 del Complemento Diamedix EZ, Diamedix Corporation, Miami, FL) en presencia de ARC913 (SEQ ID NO: 75) titulado. El ensayo se realizó en solución salina tamponada con veronal que contenía calcio, magnesio y gelatina al 1% (tampón del complemento GVB⁺⁺) y se incubó durante 1 hora a 25 °C. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron. La densidad óptica a 415 nm (DO₄₁₅) del sobrenadante se leyó. La inhibición de la actividad de la hemólisis se expresa como el % de la actividad de la hemólisis en comparación con el control. Véase la figura 20. La CI₅₀ del aptámero se calculó que era de aproximadamente 30 nM.

EJEMPLO 3

Composición y Optimización de la Secuencia

25

Ejemplo 3A: Minimización de ARC913:

- [00220]** Se transcribieron seis construcciones basadas en ARC913 (SEQ ID NO: 75), se purificaron en gel y se probaron en transferencia "dot blot" para la unión a C5. ARC954 fue similar al clon original con una K_d de 130 nM y un grado de unión del 20%, mientras que ARC874 (SEQ ID NO: 76), fue el único clon diferente que se unió a C5 con una K_d de 1 uM.

- [00221]** Las secuencias individuales enumeradas en la Tabla 6 se enumeran en la dirección 5' a 3' y se obtuvieron a partir de los aptámeros que se seleccionaron en las condiciones de SELEX dRmY proporcionadas. En las realizaciones de la memoria derivadas de esta selección (y como se refleja en la lista 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 o no contener protección (por ejemplo, dT 3'-invertido).

[00222] Tabla 6. Secuencias nucleotídicas de los clones minimizados de ARC913

40

ARC874 (SEQ ID NO: 76)

CCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGG

ARC875 (SEQ ID NO: 77)

45 CCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAAACGCAGGG

ARC876 (SEQ ID NO: 78)

GGGUUUGGCACAGGCAUACAUACCC

ARC877 (SEQ ID NO: 79)

GGGUUUGGCACAGGCAUACAAACCC

ARC878 (SEQ ID NO: 80)

GGCGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGCC

55

ARC954 (SEQ ID NO: 81)

CGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGAUCG

Ejemplo 3B: Optimización de ARC913: Reselección Adulterada

60

- [00223]** Con el fin de optimizar el clon ARC913 (SEQ ID NO: 75) para la afinidad de unión a C5 y de determinar los elementos de unión clave, se realizó una reselección adulterada. Las reselecciones adulteradas se usan para explorar los requisitos de la secuencia con un clon activo o un mínimo. Las selecciones se realizan con un conjunto sintético, degenerado, que se ha diseñado en base a una sola secuencia. El nivel de degeneración usualmente varía del 70% al 85% del nucleótido de tipo natural. En general, se observan mutaciones neutras, pero en algunos casos, los cambios de la secuencia pueden dar como resultado mejoras en la afinidad. Después, la

información de la secuencia compuesta puede usarse para identificar el motivo de unión mínimo y ayudar en los esfuerzos de optimización.

[00224] Preparación del conjunto: La secuencia de la plantilla taatacgcactactataGGGAGAGGAGAGAAACGTTCTACN₍₃₀₎GTTACGACTAGCATCGATG (SEQ ID NO: 82), se basó en ARC913 (SEQ ID NO: 75) y se sintetizó con cada residuo que se originó de la región aleatoria adulterada a un nivel del 15%, es decir, en cada posición aleatoria ("N"), el residuo tiene una oportunidad del 85% de ser el nucleótido que se encuentra en la secuencia de tipo natural CTTGGTTTGGCACAGGCATACATACGCAGGGGTCGATCG (SEQ ID NO: 83), y una oportunidad del 15% de ser uno de los otros tres nucleótidos.

[00225] La plantilla y el conjunto de ARN para la reelección adulterada se prepararon básicamente como se ha descrito anteriormente. Las plantillas se amplificaron con los cebadores taatacgcactactataGGGAGAGGAGAGAAACGTTCTAC (SEQ ID NO: 84) y CATCGATGCTAGTCGTAAC (SEQ ID NO: 85). Se hicieron dos selecciones con C5 de longitud completa, una selección utilizando una concentración más alta de sal en la etapa de lavado. El protocolo de selección se realizó como se ha descrito anteriormente, con dos excepciones: 1) la Ronda 1 se hizo en placas hidrófobas (así como todas las rondas posteriores), con únicamente una etapa positiva; y 2) no se usaron competidores durante la selección. La concentración de C5 y la concentración del conjunto de ARN se mantuvieron constantes a 200 nM y 1 uM, respectivamente.

[00226] Datos de la reelección adulterada. Tanto las selecciones con sal normal como alta se enriquecieron después de 5 rondas sobre un conjunto sin tratar. En la ronda 5, la K_d del conjunto fue de aproximadamente 165 nM para la selección con sal alta y 175 nM para la selección con sal normal. El grado de unión fue de aproximadamente el 20% en el plato en ambas. Los conjuntos R4 se clonaron usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se secuenciaron 48 clones de cada conjunto. Se transcribieron 12 clones de cada conjunto y se ensayaron en un ensayo de transferencia puntual con un solo punto en C5 500 nM. Las constantes de disociación (K_d) se midieron de nuevo usando el ensayo de transferencia puntual que se ha descrito anteriormente. Las K_d se calcularon para los 11 mejores clones identificados en la selección de un solo punto, ajustando los datos a la ecuación: fracción de ARN unido = $\text{amplitud} \cdot K_d / (K_d + [C5])$. Los clones con las tres mejores K_d fueron la SEQ ID NO: 91 (73 nM), SEQ ID NO: 96 (84 nM) y la SEQ ID NO: 95 (92 nM). Las secuencias de estos 11 clones se enumeran a continuación en la Tabla 7.

[00227] Las secuencias enumeradas en la Tabla 7 se enumeran en la dirección 5' a 3' y representan las secuencias nucleotídicas de los aptámeros que se seleccionaron en las condiciones de SELEX de dRmY proporcionadas. En las realizaciones de la memoria derivadas de esta selección (y como se refleja en la lista de secuencias), las secuencias correspondientes comprenden las combinaciones dRmY de residuos, 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 pueden o no contener protección (por ejemplo, un dT 3'-invertido). Las secuencias únicas de cada aptámero que se muestra a continuación comienzan en el nucleótido 23, siguiendo inmediatamente la secuencia 5' fija GGGAGAGGAGAGAAACGUUCUAC (SEQ ID NO: 86), y transcurre hasta que se encuentra con la secuencia de ácidos nucleicos 3' fija GUUACGACUAGCAUCGAUG (SEQ ID NO: 87).

[00228] Tabla 7. Secuencias nucleotídicas de clones de reelección adulterada

(SEQ ID NO: 88)

GGGAGAGGAGAGAAACGUUCUACCUUGGUWGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGAUCGGUUACGACUAGCAUCGAUG

(SEQ ID NO: 89)

GGGAGAGGAGAGAAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGUGUCGAUCUGUUACGACUAGCAUCGAUG

(SEQ ID NO: 90)

GGGAGAGGAGAGAAACGUUCUACCUUGGUWGGCACAGGCAUAAAUACGCAGGGCUCGAUCGGUUACGACUAGCAUCGAUG

(SEQ ID NO: 91)

GGGAGAGGAGAGAAACGUUCUACCUUGGUUUGGCCAGGCAUUAUACGCAGGGAUUGAUCCGUUACGACUAGCAUCGAUG

(SEQ ID NO: 92)

GGGAGAGGAGAGAAACGWCUACCUUGGUWGGCGCAGGCAUACAUACGCAGGUCGAUCGGUUACGACUAGCAUCGAUG

(SEQ ID NO: 93)

GGGAGAGGAGAGAAACGUUCUACCUUGGUUGGGCACAGCCAACCCUACGCACGGAUCGCCCGGUUACGACUAGCAUCGAUG

(SEQ ID NO: 94)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGUCGAUCGGUUACGACUA

5 (SEQ ID NO: 95)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUAGGUUCGCACUGUCAUACAUACACACGGGCAAUCGGUUACGACUAG
CAUCGAUG

(SEQ ID NO: 96)

10 GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCWGGUWGGCNCAGGCAUANAUAACGCACGGGUCGAUCGGUUACGACUAG
CAU

(SEQ ID NO: 97)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUUCUCUGCCACAAGCAUACCUUCGCGGGGUUCUAUUGGUUACGACUA
15 GCAUCGAUG

(SEQ ID NO: 98)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUAUAUACGCAGGUCGAUCCGUUACGACUAG
CAUCGAUG
20

Ejemplo 3C: Modificación de PEG Ramificado de 40 kDa de ARC186

[00229] Eloligonucleótido 5'NH₂-

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGf CmG-3T -3'
25 (ARC672, SEQ ID NO: 63), se sintetizó en un sintetizador de ADN Expedite (ABI, Foster City, CA), de acuerdo con
los procedimientos recomendados por el fabricante, utilizando ARN 2'-OMe y ARN 2'-F y fosforamiditas ARN
protegidas con TBDMS convencionales disponibles en el mercado (Glen Research, Sterling, VA), y un soporte CPG
de desoxitimidina invertido. La función amina terminal se unió con el modificador 5'-amino C6-TFA (Glen Research,
Sterling, VA). Después de la desprotección, los oligonucleótidos se purificaron mediante cromatografía de
30 intercambio iónico en resina Super Q 5PW (30) (Tosoh Biosciences) y precipitaron en etanol.

[00230] El aptámero modificado con amina se conjugó con diferentes restos de PEG postsintéticamente. El
aptámero se disolvió en una solución de agua/DMSO (1:1) a una concentración entre 1,5 y 3 mM. Se añadió un
tampón de carbonato sódico, pH 8,5 a una concentración final de 100 mM, y el oligo se hizo reaccionar durante una
35 noche con un exceso molar de 1,7 del reactivo de PEG deseado (por ejemplo, ARC1905 de 40 kDa, éster de
carbonato de p-nitrofenilo Sunbright GL2-400NP [NOF Corp., Japón], o ARC187 de 40 kDa, éster de mPEG2-NHS
[Nektar, Huntsville AL]), disuelto en un volumen equivalente de acetonitrilo. Los productos resultantes se purificaron
mediante cromatografía de intercambio iónico sobre resina Super Q 5PW (30) (Tosoh Biosciences), y se desalaron
usando cromatografía de fase inversa realizada sobre resina Amberchrom CG300-S (Rohm y Haas), y se liofilizaron.
40 La estructura de ARC187 (SEQ ID NO: 5) se muestra en la figura 21, mientras que la estructura de ARC1905 (SEQ
ID NO: 67) se muestra en la figura 22.

EJEMPLO 4

45 **Modelo de Corazón Perfundido Aislado**

Ejemplo 4A: Prueba del Principio con ARC186

[00231] La concentración promedio del componente del complemento C5 en plasma humano es aproximadamente
50 500 nM. Tras la exposición de corazones de ratón aislados perfundidos con tampón de Krebs Heinseleit en plasma
humano al 6%, la cascada del complemento humano se activa, conduciendo a la 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 conocido como el "complejo de ataque a membrana" ("MAC" o C5b-9), que daña los vasos sanguíneos del
corazón y los miocitos cardiacos, conduciendo así a una disfunción de miocardio (aumento de la presión diastólica
55 final, arritmias) y asístole (Evans y col., Molecular Immunology, 32, 1183-1195 (1995)). Previamente, los anticuerpos
monoclonales y de una sola cadena que bloquean la escisión de C5 humano (Pexelizumab o una versión scFv de
una sola cadena de Pexelizumab) se probaron en este modelo, y demostraron inhibir el daño y la disfunción al
miocardio (Evans y col., 1995).

[00232] Este modelo se usó para establecer que el aptámero de bloqueo de C5 ARC186 (SEQ ID NO: 4), como
Pexelizumab, inhibió el daño del complemento mediado por C5 humano a los corazones de ratón perfundidos
aislados. Se adquirieron ratones C57 Bl/6 en Charles River Laboratories (Wilmington, MA). En resumen, después de
la inducción de anestesia profunda, cada corazón de ratón se extrajo y se montó en una aguja roma insertada en la
aorta, a través de la cual el corazón se perfundió de manera continua con tampón de Krebs Heinseleit. Un
65 transductor de presión (Mouse Specifics, Boston, MA) se insertó en el ventrículo izquierdo, permitiendo la medición
continua de la frecuencia cardíaca y la presión intraventricular. Después de un periodo de 15 de equilibrio durante el

cual se tomaron las mediciones de la línea basal, los corazones se perfundieron posteriormente con tampón y plasma humano al 6% +/- aptámero a diversas concentraciones (véase la figura 23). Durante estos estudios, y como se describe en Evans y col., se demuestra que los corazones que se perfundieron con tampón de Krebs Heinseleit + plasma humano al 6%, experimentaron un fallo en el transcurso de 5 minutos de la adición del plasma al perfusado, mientras que los corazones que se perfundieron de manera continua con el tampón solo, continuaron latiendo en exceso de dos horas. Por lo tanto, la longitud de cada experimento se definió de manera arbitraria como 15 minutos. La exposición de este estudio con ARC186 se presenta en la figura 23.

[00233] La presión intraventricular se supervisó y se registró de manera continua, dando como resultado el trazado de la onda de la presión (figuras 24 y 25). El punto de deflexión más bajo representa la presión diastólica final ("EDP") y el punto de deflexión más alto representa la presión sistólica ("SP"). Las ondas de la presión de la línea basal aparecen a la izquierda de la línea negra vertical marcada "O" mostrada en cada trazo. Como se ha publicado previamente (Evans y col., 1995), los corazones perfundidos con plasma humano al 6%, experimentaron un incremento rápido en la presión diastólica final ventricular izquierda, culminando finalmente en asístole (el corazón se detiene) en el transcurso de 5 minutos (figura 24). Cuando el aptámero irrelevante se añadió al plasma humano en un exceso molar de 50 veces, también se observaron un aumento de EDP y asístole (figura 24).

[00234] Cuando se añadió ARC186 al sistema a equivalencia molar, hubo también un aumento precipitado en la EDP, culminando en asístole (figura 25). En los tres grupos de corazones que experimentaron el daño mediado por el complemento, aumento de EDP y asístole, el corazón era 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 ondas de la presión ventricular permanecieron normales y no se observó asístole. Además, el edema y la turgencia que se han descrito previamente no eran evidentes en estos grupos.

[00235] 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 en forma de gráfico. Como se muestra en la figura 26, los corazones perfundidos sin aptámero o con el aptámero irrelevante, desarrollaron asístole rápidamente, normalmente en el transcurso de 5 minutos. El ARC186 añadido al sistema en una equivalencia molar, retrasó ligeramente el inicio de la asístole. Los corazones en este grupo fallaron finalmente, sin embargo, el ARC186 añadido al plasma en un exceso molar de 10 veces o 50 veces conservó, la frecuencia cardíaca durante todo el experimento.

[00236] El porcentaje de aumento en el peso cardíaco con respecto a la lineal basal se calculó para una muestra representativa de corazones que fallaron (sin aptámero o exceso molar de 50 veces de aptámero irrelevante), y se comparó con los corazones protegidos con ARC186 (exceso molar de 10 veces y 50 veces de ARC186). Como se muestra en la figura 27, los corazones protegidos con ARC186 ganaron significativamente menos peso que los corazones que fallaron en los grupos de control.

[00237] Debido a que ARC186 inhibe la escisión de C5, pero no la escisión de C3, los productos de escisión C3 (C3a), pero no los productos de la escisión de C5 (C5a o C5b), deben encontrarse en el efluente que fluye de los corazones aislados protegidos por ARC186. Para mostrar directamente que ARC186 inhibió la escisión de C5 de plasma humano, los niveles relativos de las proteínas del complemento humanas C5a y C5b (productos de escisión de C5) y C3a (un producto de escisión de C3) se midieron en el efluente del tampón de los diversos grupos, mediante kits ELISA disponibles en el mercado (kit ELISA para C5b-9, Quidel, San Diego, CA; kit ELISA para C5a y C3a, BD Biosciences, San Diego, CA). ARC186 inhibió la escisión de C5 en plasma humano y la producción de C5a (figura 28) y C5b-9 (figura 29) de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, ARC186 no tuvo efecto en la escisión de C3 humana en C3a y C3b (figura 30) demostrando adicionalmente la especificidad de C5 de la molécula.

[00238] Una vez generados, los fragmentos de C3b y C5b del complemento se depositan localmente en los tejidos en la proximidad del sitio de activación del complemento. Después de la terminación de los experimentos, los corazones de ratón se congelaron en medio OCT (Sakura Finetelc, Torrance, CA), se seccionaron y a continuación se tiñeron usando inmunohistoquímica convencional para la presencia de C3b humana (clon H11, Chemicon, Temecula, CA), C5b-9 humano (clon aE11, DAKO, Carpinteria, CA) o IgG de ratón de control (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Los resultados del estudio se presentan en la figura 31.

[00239] Como se describió en este estudio, el aptámero de bloqueo de C5 ARC186, se probó en un modelo ex vivo del daño tisular mediado por C5 del componente del complemento, que usa corazones de ratón aislados, perfundidos con tampón de Krebs Heinseleit y plasma humano heparinizado al 6%, en base a un modelo descrito en un estudio que se ha publicado previamente que demostró los efectos del anticuerpo anti-C5, Pexelizumab sobre el sistema del complemento (Evans, Molecular Immunol 32: 1183 (1995)). Usando este modelo, se demostró que el aptámero de bloqueo de C5 (a) inhibió la escisión de C5 del plasma humano (pero no de C3), (b) inhibió la deposición de C5b humano (pero no de C3b) en el tejido cardíaco de ratón e (c) inhibió la disfunción de miocardio mediada por C5b-9 humano a concentraciones clínicamente relevantes (5 μ M, un exceso molar de 10 de aptámero frente a C5). Estos datos muestran que cuando la cascada del complemento humano se activa de una manera fisiológicamente relevante, los aptámeros de bloqueo de C5 son capaces de inhibir la escisión de C5 en plasma e impedir el daño y la disfunción de miocardio.

Ejemplo 4B: Eficacia del Aptámero PEGilado

[00240] El material y los procedimientos 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 utilizó plasma heparinizado humano (Center for Blood Research, Harvard Medical School, Boston, MA) como una fuente del complemento, y la segunda mitad utilizó plasma de mono cynomolgus heparinizado (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) como una fuente del complemento. Se añadió un aptámero PEGilado (ARC658; SEQ ID NO: 62) al sistema a relaciones molares en aumento. Aunque todos los trazados de la presión ventricular relevantes se recogieron, la tabla enumera la presencia o ausencia de un aumento en la presión diastólica final (EDP), haya o no asístole, y el tiempo hasta el fallo cardíaco (definida como la presencia de una EDP elevada y asístole).

[00241] Durante los experimentos con plasma humano, la dosis óptima de ARC658 (SEQ ID NO: 62), se determinó como una equivalencia molar (500 nM), mientras que durante los experimentos con plasma de primate no humano, fue necesario un exceso molar de 50 veces (25 μ M) para proteger el corazón del daño mediado por C5b (véase la figura 32).

[00242] Estos datos son consistentes con la diferencia en la afinidad del aptámero anti-C5 para C5 humano frente a primate no humano indicada por los datos *in vitro*. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, durante estos estudios posteriores con mono cynomolgus PK/PD que se describen en el Ejemplo 5, se demuestra adicionalmente que fue necesario un exceso molar de 30 veces de aptámero para inhibir la escisión de C5 en plasma mediada por zymosan, apoyando adicionalmente la noción de que el aptámero se une a C5 de primate con una afinidad menor que C5 humano.

[00243] De forma colectiva, estos estudios indican que tanto los aptámeros de bloqueo de C5 ARC186 (SEQ ID NO: 4) y a un mayor grado, ARC658 (SEQ ID NO: 62), son eficaces en el modelo de corazón de ratón perfundido aislado. Este modelo también demostró que tiene que usarse significativamente más ARC658 (SEQ ID NO: 62) para inhibir el daño cardíaco mediado por C5 en plasma de mono cynomolgus (exceso molar 30+), en comparación con el daño cardíaco mediado por C5 humano (equivalencia molar), apoyando adicionalmente los datos *in vitro* que indican que el aptámero tuvo una afinidad menor para C5 de primate. Finalmente, estos datos indicaron que los macacos cynomolgus necesitarán una dosificación más allá de un exceso molar de 30 veces, con el fin de demostrar *in vivo* el bloqueo de C5 durante los estudios de PK/PD.

EJEMPLO 5**Metabolismo y Farmacocinética del Fármaco de los Aptámeros Anti-C5 en Animales**

[00244] En los Ejemplos 5A-5G, todos los datos de la concentración basados en la masa se refieren sólo al peso molecular de la parte oligonucleotídica del aptámero, sin importar la masa conferida por la conjugación del PEG.

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

[00245] El precursor oligonucleotídico no PEGilado de los aptámeros (es decir, ARC186; SEQ ID NO: 4) se ensayó en plasma de rata y de mono cynomolgus (Charles River Labs, Wilmington, MA) con el fin de evaluar su estabilidad, cinética de la velocidad y vías de degradación. La prueba se realizó utilizando el aptámero radiomarcado (32 P) en el extremo 5', incubado a 37 °C en plasma agrupado al 95% (citado) durante el curso de 50 horas. En los momentos seleccionados, se extrajeron alícuotas del plasma que contenía aptámero, se ultracongelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. La detección y el análisis del aptámero y sus metabolitos en el plasma se realizó usando extracción líquido-líquido (fenol-cloroformo) seguida de electroforesis en gel (en un gel de secuenciación de poliamida desnaturalizante al 10%) y auto-radiografía de alta resolución.

[00246] La figura 33 muestra una gráfica logarítmica-lineal del porcentaje restante del aptámero de longitud completa como una función del tiempo de incubación tanto en plasma de rata como de mono cynomolgus. El perfil de degradación en ambas especies parece ser básicamente monofásico, con una constante de velocidad de aproximadamente $k = 0,002 \text{ h}^{-1}$.

Ejemplo 5B: Farmacocinética de ARC657, ARC658 y ARC187 en la rata tras una administración intravenosa

[00247] Para evaluar el perfil farmacocinético de ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) y ARC187 (SEQ ID NO: 5), y calcular el nivel de dosificación y la frecuencia requeridos en primates y seres humanos, se realizó un estudio farmacocinético en ratas Sprague-Dawley cateterizadas (Charles River Labs, Wilmington, MA). Los aptámeros se formularon para su inyección a 10 mg/ml (peso del oligo) en una solución salina convencional y se esterilizaron por filtración (0,2 μ m) en un vial de dosificación esterilizado previamente en condiciones asépticas. La ruta de administración usada para el estudio de la rata fue un bolo intravenoso a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. Los brazos del estudio consistían en 3 animales por grupo, de los cuales se tomaron sangrados

seriados previos a la dosis y en momentos especificados durante el transcurso de 48 horas. El diseño del estudio se expone en la figura 34. Las muestras de sangre se obtuvieron de catéteres en la vena yugular implantados quirúrgicamente, se transfirieron directamente a tubos recubiertos con EDTA, se mezclaron por inversión y se pusieron sobre hielo hasta el procesamiento del plasma.

5

[00248] El plasma se recolectó mediante centrifugación en tubos de sangre-EDTA a 5000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante (plasma) se transfirió a un tubo premarcado fresco. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta el momento del análisis. Los análisis de las muestras de plasma para ARC187 se realizaron usando un formato de ensayo homogéneo, utilizando la adición directa de las alícuotas de plasma a los pocillos de ensayo que contenían el reactivo de detección de ácido nucleico fluorescente disponible en el mercado Oligreen™ (Molecular Probes, Eugene, OR). Después de un breve periodo de incubación (5 min) a temperatura ambiente, protegidas de la luz, las placas de ensayo se leyeron mediante un lector de placas con 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 de la muestra se calcularon mediante interpolación de los valores de fluorescencia de una curva de fluorescencia-concentración convencional (los valores medios de las curvas por duplicado o triplicado). Las concentraciones medias en plasma se obtuvieron en cada punto de medición de los tres animales en cada grupo. Los datos de la concentración en plasma frente al tiempo se sometieron a un análisis no compartimentado (NCA) usando el programa de modelado de farmacocinética estándar en la industria WinNonLin™ v. 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Los cálculos se obtuvieron para los siguientes parámetros farmacocinéticos primarios: concentración máxima en plasma, C_{max} ; área bajo la curva de concentración-tiempo, ABC; semivida terminal, $t_{1/2}$; eliminación terminal, Cl ; y volumen de distribución en estado estacionario, V_{ss} .

[00249] Los datos de la concentración media en plasma frente al tiempo se muestran en la figura 35 y se representan en una gráfica en la figura 36. Los datos de la concentración frente al tiempo se sometieron a un análisis no compartimentado (NCA) usando WinNonLin™ v. 4.0. Este análisis proporcionó los valores presentados en la figura 37.

[00250] Como se anticipó, el aptámero de 40 kDa ARC187 (SEQ ID NO: 5) tuvo la semivida más larga, y el aptámero de 20 kDa, ARC657 (SEQ ID NO: 61), la más corta. El V_{ss} observado con relación al volumen de plasma conocido (~40 ml/kg) sugirió un grado moderado de unión/secuestro de ARC187 (SEQ ID NO: 5) a las proteínas y/o la matriz tisular en el espacio extravascular. Suponiendo la necesidad de mantener un exceso molar de 5 veces de aptámero, los resultados de este estudio sugirieron que ARC187 (SEQ ID NO: 5) proporciona una ventaja significativa en cuando a la frecuencia de dosificación y la cantidad total del aptámero necesaria para mantener los niveles en plasma deseados.

35

[00251] Los estudios previos (datos no mostrados) en roedores y primates con aptámeros de composición similar, han mostrado una proporcionalidad/linealidad de la dosis a dosis de hasta 30 mg/kg, de manera que no se anticipa que este nivel de dosificación dé como resultado un comportamiento farmacocinético no lineal.

40 **Ejemplo 5C: Farmacocinética de ARC187 y ARC1905 en el ratón después de la administración intravenosa**

[00252] Para evaluar el perfil farmacocinético de la cadena principal oligonucleotídica de ARC186 (SEQ ID NO: 4) conjugada con un PEG ramificado de 40 kDa diferente al de ARC187 (SEQ ID NO: 5), se realizó un estudio farmacocinético en ratones CD-1 hembra (obtenidos en Charles River Labs, Wilmington, MA). Los aptámeros se formularon para su inyección a 2,5 mg/ml (peso del oligo) en una solución salina convencional y se esterilizaron por filtración (0,2 µm) en un vial de dosificación esterilizado previamente en condiciones asépticas. La ruta de administración usada para el estudio del ratón fue un bolo intravenoso a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. Los brazos del estudio consistían en 3 animales por grupo, de los cuales se tomaron sangrados terminales previos a la dosis (es decir, el grupo de control no dosificado) y en momentos especificados durante el transcurso de 72 horas. El diseño del estudio se expone en la figura 38A.

[00253] Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción cardíaca terminal, se transfirieron directamente a tubos recubiertos con EDTA, se mezclaron por inversión y se pusieron sobre hielo hasta el procesamiento del plasma. El plasma se recolectó mediante centrifugación en tubos de sangre-EDTA a 5000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante (plasma) se transfirió a un tubo premarcado fresco. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta el momento del análisis. El análisis de las muestras de plasma para ARC187 y 1905 se realizó usando un formato de ensayo homogéneo, utilizando la adición directa de las alícuotas de plasma a los pocillos de ensayo que contenían el reactivo de detección de ácido nucleico fluorescente disponible en el mercado Oligreen™ (Molecular Probes, Eugene, OR). Después de un breve periodo de incubación (5 min) a temperatura ambiente, protegidas de la luz, las placas de ensayo se leyeron mediante un lector de placas con 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 de la muestra se calcularon mediante interpolación de los valores de fluorescencia de una curva de fluorescencia-concentración convencional (los valores medios de las curvas por duplicado o triplicado). Las concentraciones medias en plasma se obtuvieron en cada punto de medición de los tres animales en cada grupo. Los datos de la concentración en plasma frente al tiempo se sometieron a un análisis no compartimentado (NCA) usando el programa de modelado de farmacocinética estándar en la industria WinNonLin™

v. 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Los cálculos se obtuvieron para los siguientes parámetros farmacocinéticos primarios: concentración máxima en plasma, $C_{\text{máx}}$; área bajo la curva de concentración-tiempo, ABC; semivida terminal, $t_{1/2}$; eliminación terminal, Cl; y volumen de distribución en estado estacionario, V_{ss} . Los datos de la concentración media en plasma frente al tiempo se muestran en una gráfica en la figura 38B.

5

[00254] Los datos de la concentración frente al tiempo se sometieron a un análisis no compartimentado (NCA) utilizando WinNonLin™ v. 4.0. Este análisis proporcionó los valores presentados en la figura 38C. Como se anticipó, los PEG de 40 kDa de ambos proveedores mostraron una equivalencia farmacocinética en los ratones.

10 Ejemplo 5D: Estudio de captación tisular de los inhibidores de C5 ARC657, ARC658 y ARC187 en el ratón después de la administración de un bolo intravenoso

[00255] Los ratones CD-1 hembra se obtuvieron en Charles River Labs (Wilmington, MA). La formulación de ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) y ARC187 (SEQ ID NO: 5) para la inyección fue en una solución salina a 5 mg/ml. Las formulaciones de dosificación se esterilizaron por filtración (0,2 μm) en viales de dosificación esterilizados previamente en condiciones asépticas, y a los animales se les dio un bolo intravenoso a través de la vena de la cola a una dosis de 25 mg/kg. El estudio consistía en grupos de 3 animales para cada uno de los cuatro puntos de medición, t = pre-dosis, 3, 6, 12 h. Después de la extracción de la sangre, la vasculatura de cada animal se enjuagó de manera extensa ($V \sim 30$ ml) con una solución salina para eliminar cualquier reto de sangre dejado en la vasculatura. Los tejidos (corazón, hígado, riñón) se recolectaron, se pesaron, después se homogeneizaron al 50% p/v en una solución salina convencional, y se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis.

[00256] El análisis del tejido para ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) y ARC187 (SEQ ID NO: 5) se realizó usando un ensayo del tipo ELISA basado en hibridación. En este ensayo, una sonda de captura biotinilada se inmovilizó previamente en los pocillos de una microplaca de 96 pocillos a una concentración de solución de unión de 125 nM durante 3 h. Los pocillos de la placa se lavaron 5 veces con PBS 1 x. Después, las placas se bloquearon con 150 μl /pocillo de SuperBlock 1 x en TBS (Pierce Chemical, Rockford, IL). Las placas se lavaron de nuevo, se cubrieron y se almacenaron a 4°C hasta su uso. En tubos separados, la muestra o las muestras se atemperaron en un tampón que contenía una sonda de detección de la muestra marcada con FAM (5'-Fluoresceína) a 200 nM a 90°C durante 10 minutos, después se inactivaron sobre hielo. Los estándares de concentración y las muestras de control de plasma/tejido también se atemperaron previamente con soluciones de la sonda de detección de la muestra, y después se pipetearon en los pocillos de la placa de ensayo que contenían la sonda de captura de biotina inmovilizada, y se atemperaron a 45°C durante 2,5 h. Después, las placas se lavaron de nuevo y se llenaron con 100 μl /pocillo de una solución que contiene PBS 1 x que contenía 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo monoclonal antifluoresceína conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (MAb-HRP anti-FITC, Molecular Probes, Eugene, OR) en PBS 1 x, y se incubaron durante aproximadamente 1 h. Las placas se lavaron de nuevo como anteriormente. Después, los pocillos de la placa de ensayo se llenaron con 100 μl de una solución que contenía un sustrato 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 añadieron 100 μl /pocillo de una solución de parada para inactivar la reacción que produce el precipitado fluorescente. Las placas se leyeron inmediatamente en un lector de microplacas con fluorescencia (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) con la excitación de la fluorescencia a 325 nm y una emisión detectada a 420 nm. Cada pocillo se leyó 10 veces. Los tres aptámeros fueron detectables en el tejido cardíaco a los tres puntos de medición (figura 39).

45

Ejemplo 5E: Farmacocinética y farmacodinámica de los inhibidores de C5 ARC657, ARC658 y ARC187 en el mono cynomolgus después de la administración intravenosa-estudio 1

[00257] La formulación de ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) y ARC187 (SEQ ID NO: 5) para la inyección fue en una solución salina convencional a 10 mg/ml, y las formulaciones de dosificación se esterilizaron por filtración (0,2 μm) en viales de dosificación preesterilizados en condiciones asépticas. La ruta de administración usada para el estudio en el macaco fue un bolo intravenoso a través de un catéter en la vena femoral implantado quirúrgicamente a una dosis de 30 mg/kg (aproximadamente un exceso molar de 50 veces). El diseño del estudio se expone en la figura 40. Las muestras de sangre se obtuvieron de los catéteres de la vena femoral, se transfirieron directamente a tubos recubiertos con citrato sódico, se mezclaron por inversión y se colocaron sobre hielo hasta que se centrifugaron para separar el plasma (3000 rpm durante 5 minutos). Entonces, el plasma se dividió en alícuotas de 250 μl que se almacenaron a -80°C , y una alícuota de cada muestra se evaluó para obtener la concentración del aptámero utilizando el ensayo Oligreen™ basado en fluorescencia que se ha descrito previamente en la sección de PK de rata anterior.

60

[00258] Los datos de la concentración primaria en plasma frente a los datos del tiempo, se presentan en forma de tabla en la figura 41. Como se anticipó, el aptámero de PEG de 40 kDa ARC187 (SEQ ID NO: 5) persistió en el plasma durante el periodo más largo de tiempo, mientras que el aptámero de PEG de 20 kDa ARC657 (SEQ ID NO: 61) persistió durante la cantidad de tiempo más corta. La inspección de los datos mostrados en la figura 41 sugieren que los datos se ajustarían mejor mediante un modelo de dos compartimientos. Así, los cálculos de los parámetros

65

farmacocinéticos indicados en la figura 42, se obtuvieron a partir de un modelo de dos compartimientos, usando el programa de modelado farmacocinético estándar en la industria WinNonLin™ v. 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

- 5 **[00259]** Como se muestra en la figura 42, todos los aptámeros tuvieron un valor de $C_{\text{máx}}$ similar, entre 23 y 30 μM , indicando que la dosis del aptámero (30 mg/kg), fue suficiente para lograr un exceso molar de 50 veces el aptámero en plasma frente a la concentración de C5 (exceso molar de 50 veces, aproximadamente 25 μM). Aunque difieren en un peso molecular de 10.000, ARC657 (20 kDa PEG) (SEQ ID NO: 61) y ARC658 (30 kDa PEG) (SEQ ID NO: 62) tuvieron valores de exposición (ABC), $t_{1/2}(\alpha)$ y $t_{1/2}(\beta)$ similares. Por el contrario, ARC187 (SEQ ID NO: 5) tuvo valores
- 10 de exposición (ABC) significativamente más altos, una $t_{1/2}(\alpha)$ prolongada y una $t_{1/2}(\beta)$ ligeramente más larga que las otras moléculas.

- [00260]** Las alícuotas adicionales de las muestras de plasma recolectadas durante el estudio de la farmacocinética se analizaron posteriormente *in vitro* para determinar la eficacia del bloqueo de C5 de primate. El ensayo de
- 15 activación con zymosan se realizó como se ha descrito anteriormente para determinar la cantidad de C5b-9 y C5a de primate generada, respectivamente. Los datos se representaron en gráficas en varios formatos diferentes, incluyendo la concentración de C5b-9 frente al tiempo de la muestra (figura 43a), la concentración de C5b-9 frente a la concentración de aptámero (figura 43b), la concentración de C5a frente al tiempo de la muestra (figura 43c), y la concentración de C5a frente a la concentración de aptámero (figura 43d).

- 20 **[00261]** El aptámero de PEG de 40 kDa ARC187 (SEQ ID NO: 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 en gráficas frente a la concentración del aptámero, indicaron que la concentración de aptámero que bloquea C5 tuvo que exceder un exceso molar de 30 veces, sin importar el tamaño de las moléculas
- 25 de PEG, con el fin de que la escisión de C5 se inhiba completamente (figuras 43b y 43d).

- [00262]** En resumen, los datos del estudio de PK/PD con mono cynomolgus, demostraron que (a) como se anticipó, fue necesario al menos un exceso molar de 30 veces de aptámero (aproximadamente una concentración de aptámero en plasma de 15 μM) para inhibir la escisión de C5 *in vivo* en el mono cynomolgus, sin importar el tamaño
- 30 del grupo PEG, (b) los aptámeros de bloqueo de C5 no provocaron una toxicidad observada en estas especies, y (c) cuando los animales se dosificaron a niveles relativamente altos (exceso molar de 50 veces), los niveles de aptámero en plasma estuvieron dentro del intervalo del ensayo apropiado durante el periodo de muestreo para permitir el cálculo de los parámetros farmacocinéticos.

35 **Ejemplo 5F: Farmacocinética y farmacodinámica de los inhibidores de C5 ARC658 y ARC187 en el mono cynomolgus después de la administración intravenosa-estudio 2**

- [00263]** El estudio 2 fue similar en diseño al estudio 1 que se ha descrito anteriormente, con las siguientes excepciones, a) únicamente se evaluaron dos compuestos (ARC658 (SEQ ID NO: 62) y ARC187 (SEQ ID NO: 5); b)
- 40 el número de animales aumentó a cuatro por grupo; y c) la muestra de plasma de 1 minuto se suprimió y se reemplazó por una muestra de 144 horas para asegurar que el cálculo de la semivida terminar se basó en más puntos de datos. La formulación y dosificación de estos dos aptámeros, las técnicas de toma de muestra de sangre y el aislamiento del plasma fueron idénticas al procedimiento que se ha descrito anteriormente en el estudio 1. El diseño para el estudio 2 se resume en la figura 44.

- 45 **[00264]** Después de la terminación del estudio 2, las alícuotas en plasma se analizaron como se ha descrito en el estudio 1, para determinar a) la concentración del aptámero en plasma a diversos puntos de medición después de la administración intravenosa, y b) la eficacia del bloqueo de C5.

- 50 **[00265]** La concentración del aptámero en plasma se representó en forma de gráfico como una función del tiempo (figura 45) y los datos primarios para ARC658 (SEQ ID NO: 62) y ARC187 (SEQ ID NO: 5), se presentan en forma de tabla en las figuras 39 y 40, respectivamente. El aptámero de PEG de 40 kDa ARC187 (SEQ ID NO: 5) persistió en el plasma durante el periodo de tiempo más largo. La inspección de la figura 45 indicó que los datos se ajustarían mejor mediante un modelo de dos compartimientos. Así, los cálculos de los parámetros farmacocinéticos indicados
- 55 en la figura 46 se obtuvieron a partir de un modelo de dos compartimientos, usando WinNonLin™ v. 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

- [00266]** Comparando los parámetros farmacocinéticos generados durante el estudio 1 y el estudio 2 de PK/PD anteriores, los datos para ARC658 (SEQ ID NO: 62) y ARC187 (SEQ ID NO: 5), fueron similares con excepción de la
- 60 medición de $t_{1/2}(\alpha)$ para ARC187. Sin desear quedar ligando a teoría alguna, la discrepancia en las mediciones de $t_{1/2}(\alpha)$ (a) para ARC187 entre los dos estudios, se debe probablemente al pequeño tamaño de la muestra en el estudio piloto.

- [00267]** Como se demuestra en la figura 46, los valores de $C_{\text{máx}}$ fueron similares para ARC658 (SEQ ID NO: 62) y
- 65 ARC187 (SEQ ID NO: 5). Por el contrario, la exposición al fármaco (ABC) fue significativamente mayor en animales

tratados con ARC187 (SEQ ID NO: 5). Además, ARC187 tuvo valores prolongados de $t_{1/2}$ (α) y $t_{1/2}$ (β) en comparación con ARC658 (SEQ ID NO: 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 más eficaz *in vivo* para una dosis dada.

5

[00268] Las alícuotas adicionales de las muestras de plasma recolectadas durante el estudio de la farmacocinética se analizaron posteriormente *in vitro* para determinar la eficacia del bloqueo de C5 de primate. Como anteriormente, el ensayo de activación con zymosan se realizó para determinar la cantidad generada de C5b-9 y C5a de primate, respectivamente. Los datos se mostraron en forma de gráfico como la concentración de C5b-9 frente a la concentración del aptámero (figura 47) y la concentración de C5a frente a la concentración del aptámero (figura 48). Como se ha demostrado previamente durante el estudio 1 de PK/PD, la concentración del aptámero que bloquea C5 debe exceder un exceso molar de 30 veces (concentración de aptámero a C5 en plasma), o aproximadamente 15 μ M, sin importar el tamaño de la molécula de PEG, con el fin de que la escisión de C5 de primate se inhiba completamente (figuras 41 y 42).

10

[00269] Inspeccionando los datos en las tablas de las figuras 39 y 40, es evidente que después de un bolo IV de 30 mg/kg, ARC658 (SEQ ID NO: 62) permanece por encima de 15 μ M durante aproximadamente 4 horas, mientras que ARC187 permanece encima de 15 μ M durante aproximadamente 8 horas. Así, dada una dosis similar de fármaco, el aptámero de 40 K ARC187, proporciona una eficacia clínica aproximadamente dos veces el tiempo que el aptámero de 30 K ARC658 (SEQ ID NO: 62).

15

[00270] En resumen, los macacos cynomolgus deben tratarse con al menos un exceso molar de 30 veces de aptámero frente a C5 en plasma, con el fin de bloquear la conversión de C5 *in vivo*. Estos datos son consistentes con los estudios previos *in vitro* (hemólisis) y *ex vivo* (corazón de ratón perfundido aislado), que sugieren que los aptámeros de unión a C5 tienen una afinidad menor para C5 de primate frente a C5 humano. Se ha mostrado que los aptámeros de bloqueo de C5 pueden suministrarse de manera segura como un bolo intravenoso a una dosis de 30 mg/kg, que equivale a aproximadamente un exceso molar de 50 veces de aptámero frente concentración de C5.

25

Ejemplo 5G: Farmacocinética y farmacodinámica del inhibidor de C5 ARC187 en el mono cynomolgus después de la administración e infusión IV de un bolo

30

[00271] Los perfiles farmacocinético (PK) y farmacodinámico (PD) de ARC187 (SEQ ID NO: 5), se evaluaron también en macacos cynomolgus después de un bolo de carga intravenosa, seguido inmediatamente del inicio de una infusión intravenosa. Este diseño del estudio se muestra en la figura 49.

35

[00272] La dosis del bolo de carga y la velocidad de la infusión necesarias para lograr la concentración en plasma en estado estacionario diana de 1 μ M se calcularon usando los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir del estudio con solo el bolo IV enumerado en la figura 50.

[00273] A un total de tres macacos cynomolgus se les administró un bolo IV de ARC187 a 1 mg/kg, seguido inmediatamente del inicio de una infusión IV a una velocidad de 0,0013 mg/kg/min durante un periodo de 48 horas. Las muestras de sangre completa se recolectaron de 0 a 192 h después del tratamiento, se almacenaron sobre hielo húmedo, se procesaron para el plasma, y a continuación se almacenaron congeladas a -80 °C. La concentración de ARC187 en las muestras de plasma se determinó usando tanto un ensayo de tinción de ácidos nucleicos fluorescente (descrito en el Ejemplo 5B), como un ensayo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) validado con GLP. El procedimiento de ensayo de HPLC para la determinación de ARC187 en el plasma de los monos se validó por ClinTrials Bio-Research (Montreal, Canadá). El estudio de validación cumplió con las normas (21 CFR §58) de Buena Práctica de Laboratorio (*Good Laboratory Practice*, GLP) de la United States Food and Drug Administration (FDA). El procedimiento de ensayo por HPLC se validó con respecto a: selectividad, linealidad, límite inferior de cuantificación (LLOQ), remanente, precisión y exactitud intraensayo, precisión y exactitud interensayo, estabilidad de la solución madre, estabilidad del medio de inyección, estabilidad de la matriz a corto plazo, estabilidad a la congelación-descongelación, estabilidad de la matriz a largo plazo e integridad de la dilución. El intervalo de la concentración dinámica lineal útil del ensayo se determinó que fue de 0,080 a 50,0 μ M.

40

[00274] El perfil PK medido de ARC187 en estas condiciones se adaptó bien al perfil calculado generado usando sólo los parámetros PK del bolo IV (véase la figura 51). La concentración en plasma diana de 1 μ M se estableció en <5 min postdosis y se mantuvo durante toda la infusión. Después del cese de la infusión, el aptámero mostró una semivida de eliminación terminal, $t_{1/2}$ (β) de ~40-60 horas.

[00275] La actividad farmacodinámica de ARC187 (SEQ ID NO: 5) en el mono cynomolgus se evaluó *ex vivo* usando las muestras de plasma recogidas durante el estudio de PK en el ensayo de activación con zymosan que se ha descrito previamente, con la modificación de que el plasma de la muestra de mono cynomolgus se diluyó 10 veces en plasma humano al 10%, y a continuación se trató con 5 mg/ml de zymosan. La activación de C5, como se refleja por la aparición del producto de escisión de C5a, se midió mediante ELISA específico para C5a humana (kit ELISA para C5a, BD Biosciences, San Diego, CA). Después, la concentración de ARC187 activo en cada muestra

60

65

se cuantificó mediante comparación con una curva estándar derivada de los ensayos de zymosan, usando las muestras preparadas con niveles de ARC187 conocidos (véase la figura 52). Este estudio indica que ARC187 mantiene su actividad anticomplemento a través de la duración de, y después de la infusión, a niveles sustancialmente consistentes con el perfil farmacocinético que se ha descrito anteriormente.

5

Ejemplo 5H: Predicción del Requisito de Dosificación Humana

[00276] Los requisitos de dosificación humana para la prevención, mejora o tratamiento de las complicaciones relacionadas con la cirugía CABG, se basan en las siguientes suposiciones: en primer lugar, a los pacientes de CABG se les administrará una dosis de un solo bolo intravenoso del aptámero anti-C5 antes del inicio de la cirugía, seguido de la infusión continua para establecer y mantener una concentración en plasma en estado estacionario de 1,5 μM durante 24-48 horas tras la cirugía CABG. Los estimados de la dosis del bolo y la velocidad de infusión se basan en los cálculos usando los parámetros farmacocinéticos derivados de los estudios de bolo IV únicamente y bolo más infusión que se han descritos previamente en macacos cynomolgus. La dosis del bolo estimada de ARC187 es de 1 mg/kg, y la velocidad de infusión asociada es de 0,0013 mg/kg/minuto. Para este régimen de bolo más 48 horas de infusión, el requisito del fármaco total anticipado es de 0,4 g para ARC187, donde la masa se refiere al peso del oligonucleótido únicamente (véase la 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 PEG conjugado con la parte oligonucleotídica de ARC187, la columna tres se refiere al peso molecular de la parte oligonucleotídica de ARC187 (y será la misma para todos los aptámeros en el presente documento que comprenden ARC186 (SEQ ID NO: 4) como su secuencia oligonucleotídica), la columna 4 se refiere al peso molecular del PEG de 40 kDa conjugado ARC186 (SEQ ID NO: 4), a través de una química reactiva de amina como se ha descrito en el Ejemplo 3C anterior, la columna 5 se refiere a la semivida fase α de ARC187 en un modelo de dos compartimientos, y la columna seis se refiere a la semivida fase β de ARC187 en un modelo de dos compartimientos.

25

EJEMPLO 6

Aptámeros Anti-C5 e Interacción Heparina/Protamina

[00277] Una aplicación anticipada del aptámero anti-C5 es como una medida profiláctica para la prevención o mitigación de los efectos secundarios inflamatorios asociados con la cirugía de revascularización coronaria (CABG). Típicamente, se administran altas concentraciones del anticoagulante heparina (3-5 unidades/ml o 1-2 μM) durante la CABG para evitar la trombosis y mantener la permeabilidad en los componentes de la bomba de derivación; la inversión del efecto de la heparina después del procedimiento, y la restauración de la hemostasis normal, se logra mediante la administración de concentraciones similarmente altas de protamina (~5 μM). Dados los peligros potenciales para los pacientes de cualquier interferencia en la eficacia de cualquiera de estos fármacos, fue necesario demostrar que los aptámeros anti-C5, (1) no alteran las actividades de ningún fármaco, y (2) no muestran efectos inherentes en la hemostasis que puedan complicar el tratamiento anticoagulación del paciente.

[00278] 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, fomentando las interacciones con antitrombina. La protamina, un polipéptido altamente cargado de manera positiva, es capaz de bloquear la actividad de la heparina a través de una interacción caracterizada de manera deficiente, que es tiene una naturaleza al menos parcialmente electrostática. El núcleo funcional de ARC187 (SEQ ID NO: 5), como la heparina, es altamente aniónico. Así, es concebible que ARC187 pueda unirse de manera no específica a los sitios de unión de la heparina o protamina, e interferir con las actividades de estas moléculas. Los siguientes estudios investigaron las propiedades anticoagulantes inherentes (es decir, similares a la heparina) de ARC187, los efectos de ARC187 en la función de la heparina, los efectos de ARC187 en la neutralización de la heparina por la protamina, y los efectos de la protamina en las propiedades que inhiben el complemento de ARC187.

50

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

[00279] Los efectos inherentes de ARC187 (SEQ ID NO: 5) en la coagulabilidad del plasma se investigaron usando pruebas clínicas convencionales de los brazos extrínsecos e intrínsecos de la cascada de coagulación, el tiempo de la protrombina (PT) y el tiempo de la tromboplastina parcial activado (aPTT), respectivamente. Como se muestra en la figura 54, la titulación del plasma humano citrado con concentraciones muy en exceso de las dosis proyectadas (hasta 20 μM) no dio como resultado ningún cambio en el PT, sino únicamente una ligera elevación en aPTT.

[00280] Para evaluar los efectos *in vitro* de ARC187 en las funciones de la heparina y la protamina, se extrajo la sangre de 3 individuos en 4-5 unidades/ml de heparina, dosis asociadas con niveles de heparina utilizados en la cirugía CABG. La coagulabilidad de estas muestras se evaluó usando el tiempo del coágulo activado (ACT), una prueba de coagulación de sangre completa usada de manera rutinaria para controlar la actividad de la heparina durante la cirugía. A estas concentraciones de heparina, en ausencia de otros aditivos, el ACT se prolongó de manera significativa de un valor de la 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 ARC187 10 μM a estas muestras tuvo

65

poco efecto en el tiempo del coágulo, demostrando que ARC187 no interfiere con la actividad anticoagulante de la heparina.

[00281] El efecto anticoagulante de la heparina se neutralizó fácilmente mediante titulación 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 las concentraciones neutralizantes de protamina, fueron básicamente indistinguibles de la línea basal. Puesto que el núcleo del ácido nucleico de ARC187 (12 kDa) tiene un peso molecular mayor que la protamina (5 kDa), se podría esperar que las concentraciones equimolares de ARC187 añadidas a la protamina fueran suficientes para invertir completamente la actividad neutralizante de la protamina. Sin embargo, la incubación previa de la protamina con aproximadamente concentraciones equivalentes de ARC187, tuvo poco efecto en el ACT. Las muestras de sangre que contenían concentraciones neutralizantes de protamina, mostraron valores de ACT similares en presencia o ausencia de ARC187 10 μM , indicando que ARC187 tiene sólo un ligero efecto, si lo hubiera, en la actividad procoagulante de la protamina. Estos resultados se resumen en la figura 55.

15 **Ejemplo 6B: Efecto *in vivo* de ARC187 en la coagulación**

[00282] Las interacciones entre la función de la heparina y la protamina durante la administración concurrente del aptámero anti-C5 ARC187 (SEQ ID NO: 5), a dosis clínicas de heparina y dosis clínicas/subclínicas/superclínicas de protamina, se investigaron para determinar si la presencia de concentraciones subclínicas/superclínicas en plasma de ARC187 interferirá con la inversión de la anticoagulación de la heparina por la protamina. Los resultados del estudio se resumen en la figura 56. En resumen, los valores de ACT de la línea basal no se afectaron por 10 μM (es decir, un exceso molar de 10 veces de la dosis clínica) de ARC187 en todas las dosis de heparina probadas. De manera similar, el grado de anticoagulación por la heparina no se afectó por ARC187 10 μM . En ausencia de ARC187, la dosis eficaz mínima de protamina fue ~30% (dosis clínica = 100%). Además, la inversión de la anticoagulación de heparina por protamina al 30% no se afectó por un exceso molar de 10 veces la dosis clínica (es decir, 10 μM) de ARC187. Así, el uso de ARC187 para la inhibición del complemento en un entorno clínico (por ejemplo, CABG), no debe afectarse por el uso concurrente de heparina y protamina a dosis típicas.

30 **Ejemplo 6C: Efecto de la heparina y la protamina en la función anticomplemento de ARC187**

[00283] Los efectos de la heparina y la protamina en la actividad anticomplemento de ARC187 (SEQ ID NO: 5), se examinaron en muestras de sangre completa citrada activadas con zymosan, como se ha descrito en el Ejemplo 1. Justo antes de la activación con zymosan, ARC187 se tituló en las muestras de sangre citrada tratadas en cuatro condiciones: 1) sin tratamiento (sin heparina o protamina); 2) 4 U/ml de heparina; 3) 6 μM de protamina; 4) 4 U/ml de heparina + 6 μM de protamina. Después de la activación con zymosan, la activación de C5 se cuantificó mediante medición con ELISA de sC5b-9 en plasma (kit ELISA para C5b-9, Quidel, San Diego, CA). Para cada condición, los resultados, expresados como el porcentaje de inhibición de la activación de C5 frente a la concentración de ARC187, fueron indistinguibles dentro del error (véase la figura 57). En todos los casos, la inhibición completa se logró con ARC187 1-2 μM . Así, la heparina y la protamina, de manera separada o combinadas a concentraciones relevantes para su uso en la cirugía CABG, no parecen tener efecto en la actividad anticomplemento de ARC187.

[00284] Habiéndose descrito ahora la invención a modo de descripción y ejemplo, los expertos en la técnica reconocerán que la invención pueden ponerse en práctica en una diversidad de realizaciones, y que la descripción y los ejemplos anteriores son con fines de ilustración y no de limitación de las siguientes reivindicaciones.

45 LISTA DE SECUENCIAS

[00285]

50 <110> Archemix Corp., y col.

<120> Agentes Terapéuticos a base de Aptámero Útiles en el Tratamiento de Trastornos Relacionados con Complemento

55 <130> 23239-576-061

<140> US2005/004606

<141> 14/02/2005

60 <150> 60/608.048

<151> 07/09/2004

<150> 60/581.685

<151> 21/06/2004

65

<150> 60/547.747
 <151> 25/02/2004

 <150> 60/544.542
 5 <151> 12/02/2004

 <160> 102

 <170> PatentIn versión 3.3
 10 <210> 1
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> aptámero sintético

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <223> citosina en las posiciones 3, 4, 6 y 37 son 2'-flúor

 <220>
 <221> misc_feature
 25 <223> uridina en las posiciones 9, 30 y 31 son 2'-flúor

 <220>
 <221> misc_feature
 <222>
 30 <223> n en la posición 1 es 2'-flúor citidina o 2'-O-metil citidina

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

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 40 <223> n en la posición 7 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 45 <223> n en la posición 8 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (10)..(10)
 50 <223> n en la posición 10 es 2'-flúor citosina o desoxi citidina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 55 <223> n en la posición 11 es 2'-flúor uridina o desoxi timidina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 60 <223> n en la posición 12 es 2'-flúor citosina o desoxi citidina

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 65 <223> n en la posición 13 es 2'-OH adenosina o 2'-O-metil adenosina

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

<221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> n en la posición 28 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina

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

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

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

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

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

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

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

40 <400> 1
 nnccgcnnun nnnnnngnnn nnnnnnnnnu unnnnncn 38
 <210> 2

45 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>

50 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)

55 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi, y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 <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 guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 <400> 2

65 cgccgcgguc ttaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 3
 <211> 42
 <212> ARN
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> aptámero sintético

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

 15 <400> 3

 gacgaugcgg ucucaugcgu cgagugugag uuuaaccuucg uc 42

 <210> 4
 20 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 25 <223> aptámero sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 30 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

 <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 guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (39)..(39)
 <223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')

 <400> 4

 45 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

 <210> 5
 <211> 39
 <212> ADN
 50 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> aptámero sintético

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 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 al nucleótido mediante un enlazador amina
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor
 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 guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')
 10
 <400> 5

 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39
 15 <210> 6
 <211> 44
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 20 <220>
 <223> aptámero sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(44)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

 <400> 6
 30 aggacgaugc ggucucaugc gucgagugug aguuuacuu cguc 44

 <210> 7
 <211> 40
 <212> ARN
 35 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> aptámero sintético
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor
 45 <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 guanosina es 2'-OH, y en las posiciones 1 y 34, en las que adenosina es 2'-OH
 50
 <400> 7

 agcgccgcgg ucucaggcgc ugagucugag uuuaccugcg 40
 55 <210> 8
 <211> 40
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 60 <220>
 <223> aptámero sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (1)..(40)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

<400> 8

ggcgccgcgg ucucagggcg ugagucugag uuuaccugcg 40

5 <210> 9
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> aptámero sintético

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

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16, 24, 33 y 34, en las que citidina es desoxi, y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')

30 <400> 9

cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcgt 39

35 <210> 10
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> aptámero sintético

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

<220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor, excepto en las posiciones 10, 12, 16, 24, 33 y 34, en las que citidina es desoxi; en las posiciones 1, 3 y 37, en las que citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')

60 <400> 10

cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcgt 39

65 <210> 11
 <211> 38

<212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 5 <223> aptámero sintético

 <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 guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 1, 3, 10, 12, 16, 24 y 37, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

 <400> 11
 20 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

 <210> 12
 <211> 38
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <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 guanosina es 2'-OH, y la
 35 posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 40 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 1, 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi, y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

 <400> 12
 45 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

 <210> 13
 <211> 38
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <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 guanosina es 2'-OH, y la
 60 posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 65 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 3, 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

<400> 13

cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

5 <210> 14
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> aptámero sintético

<220>

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

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16, 24 y 37, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

25 <400> 14

cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

30 <210> 15
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

35 <220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature

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

<220>

45 <221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16, y 24, en las que citidina es desoxi; en la posición 3, en la que citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

50 <400> 15

cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 16

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

<220>

60 <223> aptámero sintético

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

65 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

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

<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 guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

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

 <400> 19
 15 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

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

 <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 guanosina es 2'-OH, y la
 30 posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 35 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 6, 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

 <400> 20
 40 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

 <210> 21
 <211> 38
 <212> ADN
 45 <213> secuencia artificial

 <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 guanosina es 2'-OH, y la
 posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 4, 6, 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi;
 60 y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

 <400> 21
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38
 65
 <210> 22

<211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16, 18 y 24, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 20 <400> 22
 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38
 <210> 23
 25 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 30 <223> aptámero sintético
 <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 guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 19, 23 y 25, que son desoxi timidina
 <400> 23
 45 cgccgcgguc tcaggcgctg agtctgaguu uaccugcg 38
 <210> 24
 <211> 38
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <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 guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 65 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16, 18 y 24, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 19, 23 y 25, que son desoxi timidina

<400> 24

cgccgcgguc tcaggcgctg agtctgaguu uaccugcg 38

5 <210> 25
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> aptámero sintético

<220>

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

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

25 <400> 25

cgccgcgguc tcaggcgcu agtctgagtu uaccugcg 38

30 <210> 26
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

35 <220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature

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

<220>

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

50 <400> 26

cgccgcgguc tcaggcgcu agtctgagut uaccugcg 38

<210> 27

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

<220>

60 <223> aptámero sintético

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

65 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 5 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23, 25 y 31, que son desoxi timidina
 <400> 27
 10 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu taccugcg 38
 <210> 28
 <211> 38
 <212> ADN
 15 <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 guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23, 25, 29, 30 y 31, que son desoxi timidina
 30 <400> 28
 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgagtt taccugcg 38
 35 <210> 29
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40 <220>
 <223> aptámero sintético
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23, 25 y 35, que son desoxi timidina
 55 <400> 29
 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uacctgcg 38
 60 <210> 30
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 65 <220>
 <223> aptámero sintético

<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 guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

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

 <400> 30
 15 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

 <210> 31
 <211> 38
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <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 guanosina es 2'-OH, y la
 30 posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 35 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en la posición 4, en la que citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

 <400> 31
 40 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

 <210> 32
 <211> 38
 <212> ADN
 45 <213> secuencia artificial

 <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 guanosina es 2'-OH, y la
 posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en
 60 la posición 6, en la que citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

 <400> 32
 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38
 65
 <210> 33

<211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en las posiciones 4 y 6, en las que citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 20 <400> 33
 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38
 <210> 34
 25 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 30 <223> aptámero sintético
 <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 guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; y en la posición 18, en la que citosina es 2'-O-metilo
 <400> 34
 45 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcg 38
 <210> 35
 <211> 38
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <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 guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 65 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; y en la posición 19, en la que uridina es 2'-O-metilo

<400> 35

cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcg 38

5 <210> 36
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> aptámero sintético

<220>

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

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en la posición 18, en la que citosina es 2'-O-metilo; y en la posición 19, en la que uridina es 2'-O-metilo

25 <400> 36

cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcg 38

30 <210> 37
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencia artificial

35 <220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature

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

<220>

45 <221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en la posición 29, en la que uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

50 <400> 37

cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 38

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

<220>

60 <223> aptámero sintético

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

65 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 5 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en la posición 30, en la que uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 <400> 38
 10 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38
 <210> 39
 <211> 38
 <212> ADN
 15 <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 guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en la posición 31, en la que uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 30 <400> 39
 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38
 35 <210> 40
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40 <220>
 <223> aptámero sintético
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en las posiciones 29, 30 y 31, en las que uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 55 <400> 40
 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38
 60 <210> 41
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 65 <220>
 <223> aptámero sintético

<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 guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

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

 <400> 41
 15 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

 <210> 42
 <211> 38
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> aptámero sintético
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en la posición 5, en la que guanosina es desoxi; en la posición 17, en las que guanosina es 2'-OH; y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 30

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

 <400> 42
 40 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38

 <210> 43
 <211> 38
 <212> ADN
 45 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> aptámero sintético
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en la posición 5, en las que guanosina es 2'-OH; en la posición 17, en la que guanosina es desoxi; y la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 60

 <400> 43
 cgccgcgguc tcaggcguc agtctgaguu uaccugcg 38
 65
 <210> 44

<211> 38
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(38)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH; y la posición 32, en la que adenosina es desoxi
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
 20 <400> 44
 cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38
 <210> 45
 25 <211> 40
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 30 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 35 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 6 y 18, en las que guanosina es 2'-OH; y la posición 33, en la que adenosina es 2'-OH
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1)..(40)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 11, 13, 17 y 25, en las que citidina es desoxi; en la posición 40, en la que citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 12, 24 y 26, que son desoxi timidina
 <400> 45
 45 ggcugcgguu ctcaggcgcu gactctgagu uuaccuacgc 40
 <210> 46
 <211> 38
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <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 guanosina es 2'-OH; y la posición 32, en la que adenosina es desoxi
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 65 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en las posiciones 36, 37 y 38 en las que citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

<400> 46

gggcgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccuccc 38

5 <210> 47
<211> 40
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> aptámero sintético

<220>

15 <221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 6 y 18, en las que guanosina es 2'-OH; y la posición 33, en la que adenosina es 2'-OH

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 11, 13, 17 y 25, en las que citidina es desoxi; en la posición 40, en la que citosina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 12, 24 y 26, que son desoxi timidina

25 <400> 47

gcgccgcggu ctcaggcgcg gagtctgagu uuaccugcgc 40

30 <210> 48
<211> 45
<212> ADN
<213> secuencia artificial

35 <220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature

40 <222> (1)..(44)
<223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 8 y 20, en las que guanosina es 2'-OH; y la posición 35 en la que adenosina es 2'-OH

<220>

45 <221> misc_feature
<222> (1)..(44)
<223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

<220>

50 <221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> timidina en la posición 45 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')

<400> 48

55 ggacgccgcg gucucaggcg cugagucuga guuuaccugc gucut45

<210> 49
<211> 42

60 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> aptámero sintético

65 <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 guanosina es 2'-OH; y en la posición 34, en la que adenosina es 2'-OH
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 <223> todas las citosinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 12, 14, 18, 26, 35 y 36, que son desoxi citidina; y en
 10 las posiciones 20, 41 y 42, en las que citosina es 2'-O-metilo
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 15 <223> todas las uridinas son 2'-flúor; excepto en la posición 21, en la que uridina es 2'-O-metilo; y en las posiciones 13, 25, 27, 31 y 37, que son desoxi timidina
 <400> 49
 20 ggcgccgcgg uctcaggcgc ugagtctgag tuuacctgcg cc 42
 <210> 50
 <211> 42
 <212> ADN
 25 <213> secuencia artificial
 <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 guanosina es 2'-OH; y en la posición 34, en la que adenosina es 2'-OH
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 <223> todas las citosinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 12, 14, 18, 26, 35, 36 y 39, que son desoxi citidina;
 40 y en las posiciones 3, 20, 41 y 42, en las que citosina es 2'-O-metilo
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 45 <223> uridina en la posición 11 es 2'-fluoro; uridina en la posición 21 es 2'-O-metilo; en las posiciones 13, 25, 27, 31, 32, 33 y 37 son desoxi timidina
 <400> 50
 50 ggcgccgcgg uctcaggcgc ugagtctgag ttacctgcg cc 42
 <210> 51
 <211> 42
 <212> ADN
 55 <213> secuencia artificial
 <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 guanosina es 2'-OH
 65 <220>
 <221> misc_feature

- <222> (1)..(42)
 <223> citosina en las posiciones 5, 6, 8, 12, 14, 18, 26, 35, 36 y 39 son desoxi citidina; y citosina en las posiciones 3, 20, 41 y 42 son 2'-O-metilo
- 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 <223> uridina en la posición 21 es 2'-O-metilo; en las posiciones 11, 13, 25, 27, 31, 32, 33 y 37 son desoxi timidina
- 10 <400> 51
 gccgcgcgcgg tctcaggcgc ugagtctgag ttacctgcg cc 42
 <210> 52
- 15 <211> 42
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 20 <223> aptámero sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 25 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que guanosina es 2'-OH
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 30 <223> uridina en las posiciones 13, 21, 25 y 27 son 2'-O-metilo; en las posiciones 11, 31, 32, 33 y 37 son desoxi timidina
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1)..(42)
 <223> citosina en las posiciones 5, 6, 8, 12, 18, 35, 36 y 39 son desoxi citidina; y citosina en las posiciones 3, 14, 20, 26, 41 y 42 son 2'-O-metilo
 <400> 52
- 40 gccgcgcgcgg tcucaggcgc ugagucugag ttacctgcg cc 42
 <210> 53
 <211> 40
 45 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> aptámero sintético
- 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> adenosina en la posición 1 tiene biotina conjugada con el extremo 5'
- 55 <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 guanosina es 2'-OH; y en la
 60 posición 2, en la que adenosina es 2'-OH
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 65 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

<400> 53

agcgccgcgg ucucagggcgc ugagucugag uuuaccugcg 40

5 <210> 54
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> aptámero sintético

<220>
 <221> misc_feature

15 <222> (1)..(42)
 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que guanosina es 2'-OH; y en la posición 34, en la que adenosina es 2'-OH

<220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)

<223> todas las citosinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 12, 14, 18 y 26, que son desoxi citidina; y en las posiciones 41 y 42, en las que citosina es 2'-O-metilo

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

30 <400> 54

ggcgccgcgg uctcagggcgc ugagtctgag uuuaccugcg cc 42

<210> 55
 35 <211> 42
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial

<220>
 40 <223> aptámero sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)

45 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que guanosina es 2'-OH; y en la posición 34, en la que adenosina es 2'-OH

<220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (1)..(42)

<223> todas las citosinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 12, 14, 18, 26, 41 y 42, en las que citosina es 2'-O-metilo

<220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)

<223> todas las uridinas son 2'-flúor; excepto en las posiciones 13, 25 y 27, en las que uridina es 2'-O-metilo

<400> 55

60 ggcgccgcgg ucucagggcgc ugagucugag uuuaccugcg cc 42

<210> 56
 <211> 39
 65 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
<223> aptámero sintético

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

10 <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 guanosina es 2'-OH

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

20 <400> 56

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 57

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

<220>

30 <223> aptámero sintético

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

35 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en la posición 18, en la que citosina es 2'-O-metilo; y en la posición 19 en la que uridina es 2'-O-metilo

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

40 <223> todas las purinas son 2'-O-metilo; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH; y en la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

<220>

45 <221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')

<400> 57

50
cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 58
<211> 39

55 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> aptámero sintético

60
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en la posición 29, que es desoxi timidina

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 guanosina es 2'-OH; y en la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')
 10
 <400> 58

 cgccgcgguc ucaggcgcug agucugagtu uaccugcgt 39
 15 <210> 59
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 20 <220>
 <223> aptámero sintético

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

 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en la posición 18, en la que citosina es 2'-O-metilo; y la posición 19, en la que uridina es 2'-O-metilo

 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (39)..(39)
 <223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')

 <400> 59
 40
 cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

 <210> 60
 <211> 39
 45 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <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 guanosina es 2'-OH
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor; excepto en la posición 18, en la que citosina es 2'-O-metilo; en la posición
 60 19, en la que uridina es 2'-O-metilo; y en la posición 29, que es desoxi timidina

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

<400> 60

cgccgcgguc ucaggcgug agucugagtu uaccugcgt 39

5 <210> 61
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> aptámero sintético

<220>
 <221> misc_feature

15 <222> (1)..(1)
 <223> citosina en la posición 1 está modificada por un PEG de 20 kDa unido al nucleótido mediante un enlazador amina

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

<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 guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

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

35 <400> 61
 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 62
 40 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 45 <223> aptámero sintético

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 50 <223> citosina en la posición 1 está modificada por un PEG de 30 kDa unido al nucleótido mediante un enlazador amina

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

<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 guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

<220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)

<223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')

<400> 62

5 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 63

<211> 39

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> aptámero sintético

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> citosina en la posición 1 está modificada por un enlazador amina 5'

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

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 guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

30

<220>

<221> misc feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')

35

<400> 63

cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

40 <210> 64

<211> 39

<212> ADN

<213> secuencia artificial

45 <220>

<223> aptámero sintético

<220>

<221> misc_feature

50 <222> (1)..(1)

<223> citosina en la posición 1 está modificada por un PEG de 10 kDa unido al nucleótido mediante un enlazador amina

<220>

55 <221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

<220>

60 <221> misc_feature

<222> (1)..(38)

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

65 <220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)
 <223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')

<400> 64

5 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 65
 <211> 39

10 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> aptámero sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> citosina en la posición 1 está modificada por un PEG lineal de 40 kDa unido al nucleótido mediante un
 20 enlazador amina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 25 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

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

<220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (39)..(39)
 <223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')

<400> 65

40 cgccgcgguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 66
 <211> 38
 <212> ARN

45 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> aptámero sintético

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> citosina en la posición 1 está modificada por un PEG de 20 kDa unido al nucleótido mediante un enlazador
 amina

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

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 guanosina es 2'-OH, y en la
 65 posición 32, en la que adenosina es 2'-OH

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> guanosina en la posición 38 está modificada por un PEG de 20 kDa unido al nucleótido mediante un
 5 enlazador amina

 <400> 66

 cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcg 38
 10
 <210> 67
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> aptámero sintético

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> citosina en la posición 1 está modificada por un PEG ramificado de 40 kDa (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-
 carbamoilo) unido al nucleótido mediante un enlazador amina
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor
 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 guanosina es 2'-OH, y en la
 posición 32, en la que adenosina es 2'-OH
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> timidina en la posición 39 es una desoxi timidina invertida 3' (vinculada a 3'-3')
 40
 <400> 67

 cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39
 45 <210> 68
 <211> 46
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 50 <220>
 <223> aptámero sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (1)..(46)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

 <400> 68
 60 ggcgauuacu gggacggacu cgcgauugua gcccagacga cucgcc 46

 <210> 69
 <211> 40
 <212> ARN
 65 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> aptámero sintético

<220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (1)..(40)
 <223> todas las pirimidinas son 2'-flúor

<400> 69
 10 ggcuucugaa gauuauuucg cgaugugaac uccagacccc 40

<210> 70
 <211> 92
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> plantilla sintética

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(69)
 <223> n puede ser cualquier nucleótido (a, c, g o t)

25 <400> 70

taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctacn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnng gtcgatcgat cgatcatcga tg 92

30 <210> 71
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 71

40 taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctac 39

<210> 72
 <211> 23
 <212> ADN
 45 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador sintético

50 <400> 72

catcgatgat cgatcgatcg acc 23

<210> 73
 55 <211> 22
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial

<220>
 60 <223> región fija sintética

<400> 73

gggagaggag agaacguucu ac 22

<210> 74
<211> 23
5 <212> ARN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> región fija sintética
10 <400> 74

ggucgaucga ucgaucg aug 23

15 <210> 75
<211> 75
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (1)..(75)
<223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

<400> 75

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggggucgauc 60

30 gaucgaucg cgaug 75

<210> 76
<211> 32
<212> ADN
35 <213> secuencia artificial

<220>
<223> aptámero sintético

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

45 <400> 76

ccuugguuug gcacaggcau acauacgcag gg 32

<210> 77
50 <211> 32
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
55 <223> aptámero sintético

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

<400> 77

ccuugguuug gcacaggcau acaaacgcag gg 32

<210> 78

<211> 25

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> aptámero sintético

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(25)

<223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

15

<400> 78

ggguuuggca caggcauaca uaccc

25

20 <210> 79

<211> 25

<212> ADN

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> aptámero sintético

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (1)..(25)

<223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

<400> 79

35 ggguuuggca caggcauaca aaccc

25

<210> 80

<211> 32

<212> ADN

40 <213> secuencia artificial

<220>

<223> aptámero sintético

45 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(32)

<223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

50 <400> 80

ggcggcacag gcauacauac gcaggggucg cc 32

<210> 81

55 <211> 47

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

60 <223> aptámero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(47)

65 <223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

<400> 81

cguucuccu ugguuuggca caggcauaca uacgcagggg ucgaucg

47

5 <210> 82

<211> 88

<212> ADN

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> plantilla sintética

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (40)..(69)

<223> n puede ser cualquier nucleótido (a, t, c o g)

<400> 82

taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctacn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

60

20 **nnnnnnnnng ttacgactag catcgatg**

88

<210> 83

<211> 39

<212> ADN

25 <213> secuencia artificial

<220>

<223> plantilla sintética

30 <400> 83

cttggtttg cacaggcata catacgcagg ggtcgatcg

39

<210> 84

35 <211> 39

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

40 <223> cebador sintético

<400> 84

taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctac

39

45

<210> 85

<211> 19

<212> ADN

<213> secuencia artificial

50

<220>

<223> cebador sintético

<400> 85

55

catcgatgct agtcgtaac

19

<210> 86

<211> 22

60 <212> ARN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> región fija sintética

<400> 86

5 gggagaggag agaacguucu ac 22

<210> 87
<211> 19
<212> ARN

10 <213> secuencia artificial

<220>
<223> región fija sintética

15 <400> 87

guuacgacua gcaucgaug 19

<210> 88

20 <211> 80
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> aptámero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(80)

30 <223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

<400> 88

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggggucgauc 60

gguuacgacu agcaucgaug 80

35

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

40

<220>
<223> aptámero sintético

<220>

45 <221> misc_feature
<222> (1)..(80)
<223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

<400> 89

50

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggugucgauc 60

uguuacgacu agcaucgaug 80

<210> 90
<211> 80

55 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> aptámero sintético

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(80)
 <223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo
 5 <400> 90

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uaaaauacgca gggcucgauc 60
gguuacgacu agcaucgaug 80
 10 <210> 91
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> aptámero sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (1)..(80)
 <223> donde 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
 25
 <210> 92
 <211> 78
 <212> ADN
 30 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> aptámero sintético
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(78)
 <223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo
 40 <400> 92

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcgcaggca uacauacgca ggucgaucgg 60
uuacgacuag caucgaug 78
 45
 <210> 93
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 50 <223> aptámero sintético

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

 <400> 93

	gggagaggag agaacguucu accuuguugu ggcacagcca acccuacgca cggaucgccc	60
	gguuacgacu agcaucgaug	80
	<210> 94	
	<211> 69	
5	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> aptámero sintético	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(69)	
	<223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo	
15	<400> 94	
	gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggucgaucgg	60
	uuacgacua	69
20	<210> 95	
	<211> 79	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> aptámero sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
30	<222> (1)..(79)	
	<223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo	
	<400> 95	
	gggagaggag agaacguucu accuuagguu cgcacuguca uacauacaca cgggcaaucg	60
35	guuacgacua gcaucgaug	79
	<210> 96	
	<211> 75	
	<212> ADN	
40	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> aptámero sintético	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(75)	
	<223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (34)..(34)	
	<223> n puede ser cualquier nucleótido (a, u, c o g)	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (43)..(43)	

<223> n puede ser cualquier nucleótido (a, u, c o g)

<400> 96

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcncaggca uanauacgca cgggucgauc 60

5 **gguuacgacu agcau 75**

<210> 97

<211> 80

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> aptámero sintético

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(80)

<223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

20 <400> 97

gggagaggag agaacguucu accuuucucu gccacaagca uaccuucgcg gggucuaau 60

gguuacgacu agcaucgaug 80

<210> 98

25 <211> 79

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

30 <223> aptámero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(79)

35 <223> donde todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metilo

<400> 98

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uauauacgca gggucgauc 60

40 **guuacgacua gcaucgaug 79**

<210> 99

<211> 93

45 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> plantilla sintética

50

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(54)

<223> n puede ser cualquier nucleótido (a, t, c o g)

55

<400> 99

catcgatgct agtcgtaacg atccnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnncgagaa 60

cgttctctcc tctccctata gtgagtcgta tta 93

<210> 100

<211> 92

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> plantilla sintética

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(53)

<223> n puede ser cualquier nucleótido (a, t, c o g)

15

<400> 100

catgcatcgc gactgactag ccgnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnngtagaac 60

gttctctcct ctccctatag tgagtcgtat ta 92

20 <210> 101

<211> 92

<212> ADN

<213> artificial

25 <220>

<223> plantilla sintética

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (24)..(53)

<223> n puede ser cualquier nucleótido (a, t, c o g)

<400> 101

catcgatcga tcgatcgaca gcgnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnngtagaac 60

gttctctcct ctccctatag tgagtcgtat ta 92

35

<210> 102

<211> 1676

<212> PRT

40 <213> artificial

<220>

<223> C5 sintética

45 <400> 102

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
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
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
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 Ala
 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			
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. Conjugado de aptámero/PEG o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que tiene la secuencia de aptámero de:

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfU
fUfCfCfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO: 4),

en el que fC y fU = 2'-flúor nucleótidos, y mG y mA = 2'-OMe nucleótidos y todos los demás nucleótidos son 2'-OH y 3T indica una desoxitimidina invertida,

en el que el extremo 5' de la secuencia de aptámero está conjugado a un resto de polietilenglicol (PEG) lineal de 40 kDa mediante un enlazador.

2. Conjugado de aptámero/PEG o una sal, según la reivindicación 1, en el que el extremo 5' de la secuencia de aptámero tienen un enlazador en 5' tal como se indica a continuación: H₂N~~~~~5' Aptámero 3', en el que ~~~~~ indica el enlazador, y en el que el aptámero modificado con amina está conjugado al resto de polietilenglicol (PEG) lineal de 40 kDa mediante un enlazador.

3. Conjugado de aptámero/PEG o una sal, según la reivindicación 1 ó 2, en el que el enlazador es un enlazador alquilo que comprende 6 grupos CH₂ consecutivos, un enlazador alquilo que comprende entre 2 y 18 grupos CH₂ consecutivos, un enlazador alquilo que comprende entre 2 y 12 grupos CH₂ consecutivos, o un enlazador alquilo que comprende entre 3 y 6 grupos CH₂ consecutivos.

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

5. Uso del conjugado de aptámero/PEG o sal, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 en un mamífero.

6. Conjugado de aptámero/PEG o sal, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en un procedimiento para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 en un mamífero.

7. Uso, según la reivindicación 5, o el conjugado de aptámero/PEG o sal para su uso en un procedimiento para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 en un mamífero, según la reivindicación 6, en el que el mamífero es un ser humano.

8. Uso, según la reivindicación 5, o el conjugado de aptámero/PEG o sal para su uso en un procedimiento para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 en un mamífero, según la reivindicación 6, en el que la enfermedad es una enfermedad isquémica aguda, una enfermedad inflamatoria aguda, o una enfermedad inflamatoria crónica o mediada por el sistema inmunitario.

9. Uso, según la reivindicación 5, o el conjugado de aptámero/PEG o sal para su uso en un procedimiento para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 en un mamífero, según la reivindicación 6, en el que la enfermedad es infarto de miocardio, ictus, lesión por isquemia/reperfusión, enfermedad infecciosa, septicemia, shock, rechazo de trasplante agudo, rechazo de trasplante hiperagudo, alergia, asma, artritis reumatoide u otra enfermedad reumatológica, esclerosis múltiple u otra enfermedad neurológica, soriasis u otra enfermedad dermatológica, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico (LES), rechazo de trasplante subagudo, rechazo de trasplante crónico, o glomerulonefritis u otra enfermedad renal.

10. Uso, según la reivindicación 5, o el conjugado de aptámero/PEG o sal para su uso en un procedimiento para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 en un mamífero, según la reivindicación 6, en el que la enfermedad es una lesión de miocardio relacionada con cirugía de revascularización coronaria (CABG), lesión de miocardio relacionada con angioplastia de globo, o lesión de miocardio relacionada con restenosis.

11. Uso, según la reivindicación 5, o el conjugado de aptámero/PEG o sal para su uso en un procedimiento para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 en un mamífero, según la reivindicación 6, en el que la enfermedad que se va a tratar es una complicación mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 relacionada con una cirugía CABG.

12. Uso, según la reivindicación 5, o el conjugado de aptámero/PEG o sal para su uso en un procedimiento para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 en un mamífero, según la reivindicación 6, en el que el conjugado de aptámero/PEG se administra peri-operativamente.
- 5
13. Uso, según la reivindicación 5, o el conjugado de aptámero/PEG o sal para su uso en un procedimiento para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad mediada por la proteína del complemento C5, C5a y/o C5b-9 en un mamífero, según la reivindicación 6, en el que el conjugado de aptámero/PEG se administra por vía intravenosa.
- 10
14. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* que comprende poner en contacto el conjugado de aptámero/PEG o sal, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 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.
- 15
15. Procedimiento de diagnóstico, según la reivindicación 14, en el que la proteína del complemento C5, o variante de la misma, es una proteína del complemento C5 humana, o una variante de la misma.
- 20
16. Conjugado de aptámero/PEG o sal, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en diagnóstico *in vitro*.
17. Conjugado de aptámero/PEG o sal, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en diagnóstico *in vivo*.
- 25
18. Conjugado de aptámero/PEG o sal, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad *in vivo*.

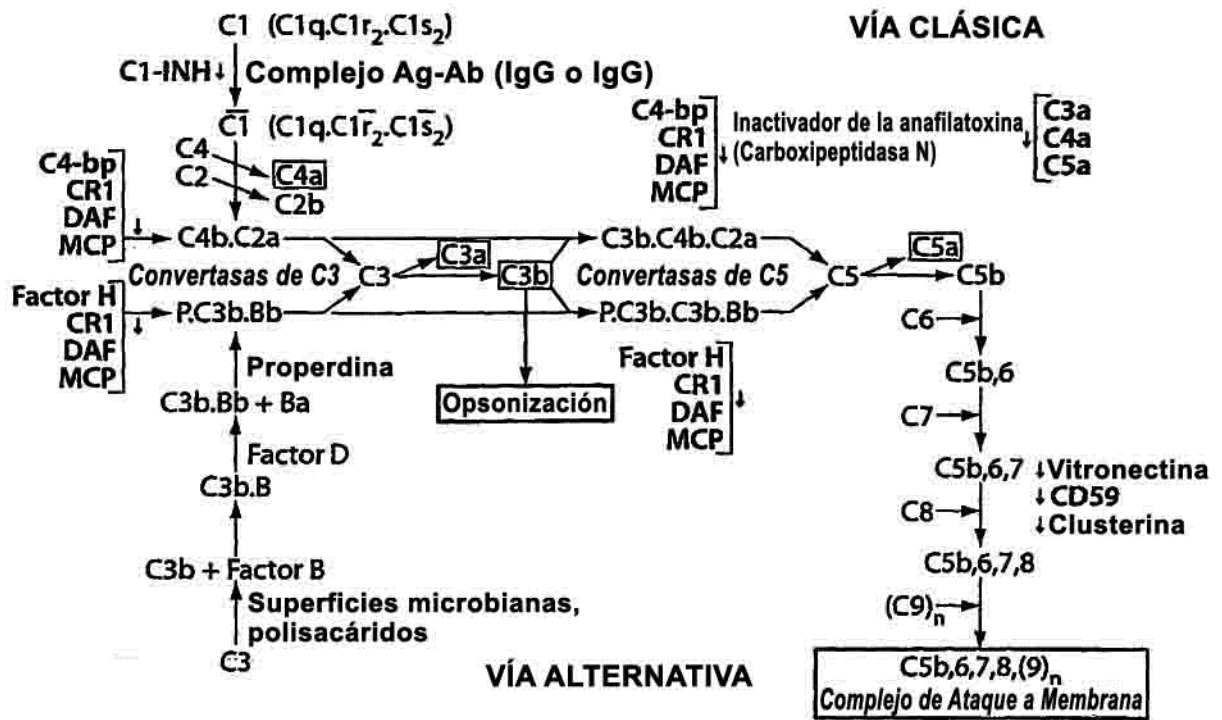


Fig. 1

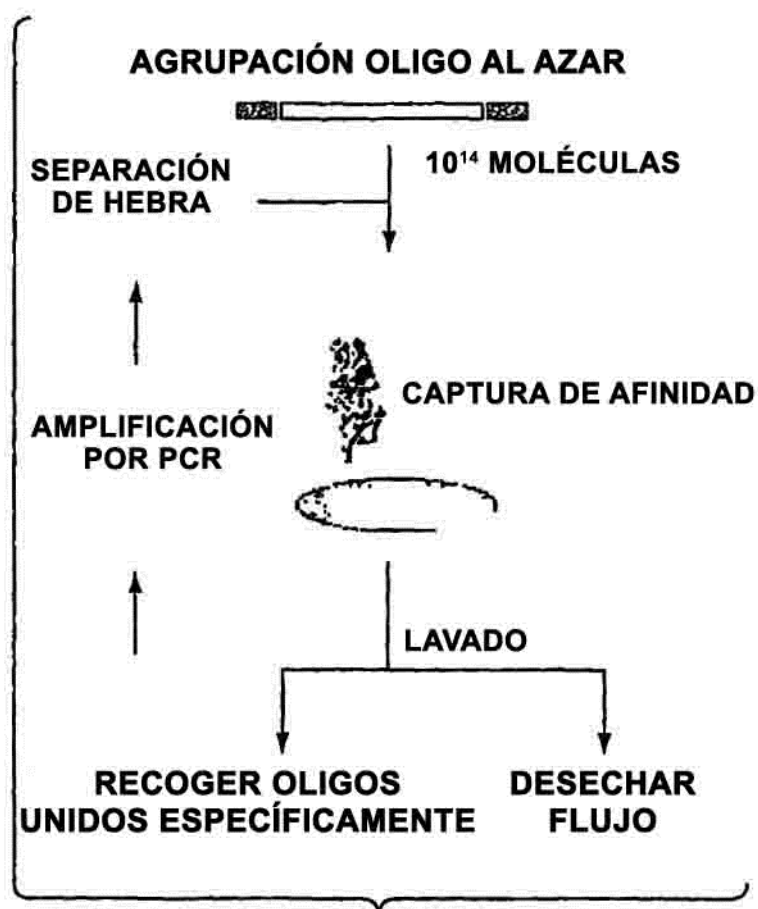


Fig. 2

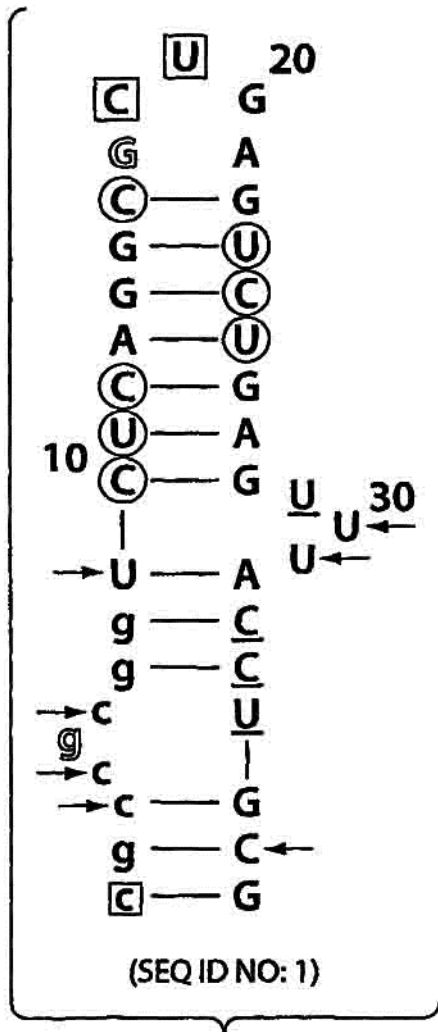


Fig. 3A

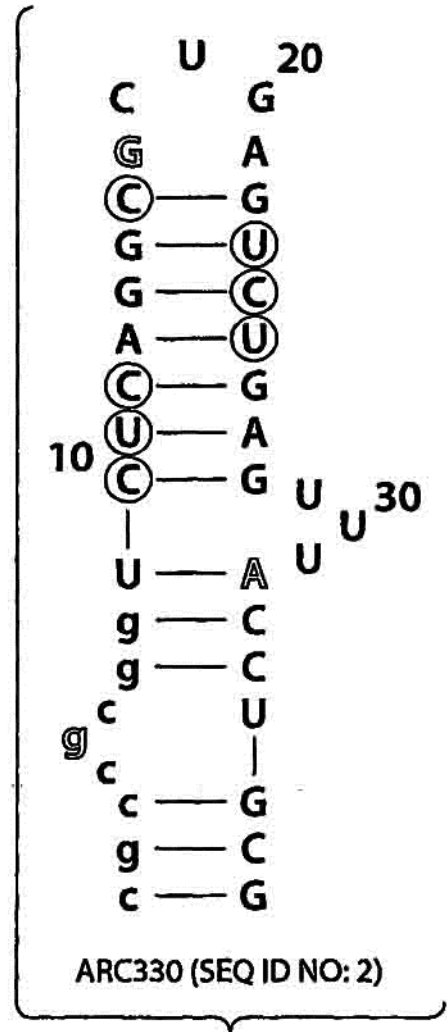


Fig. 3B

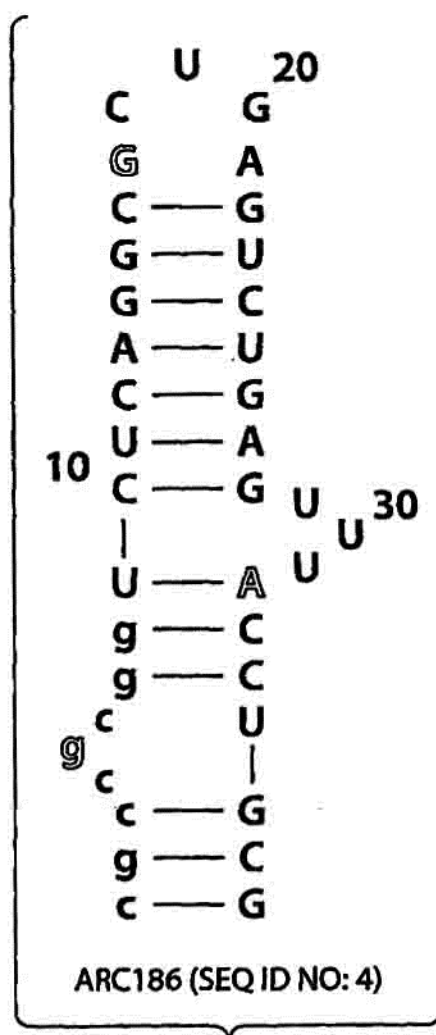


Fig. 3C

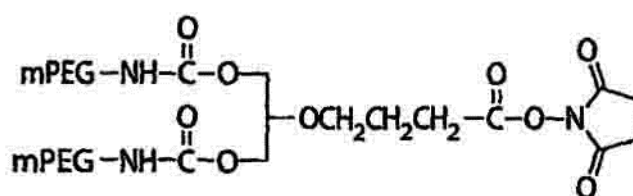


Fig. 4

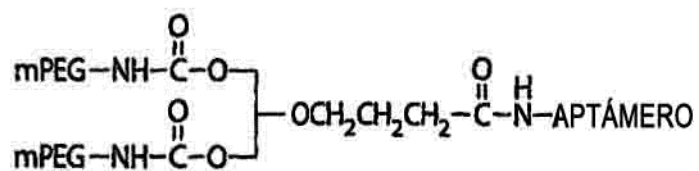


Fig. 5

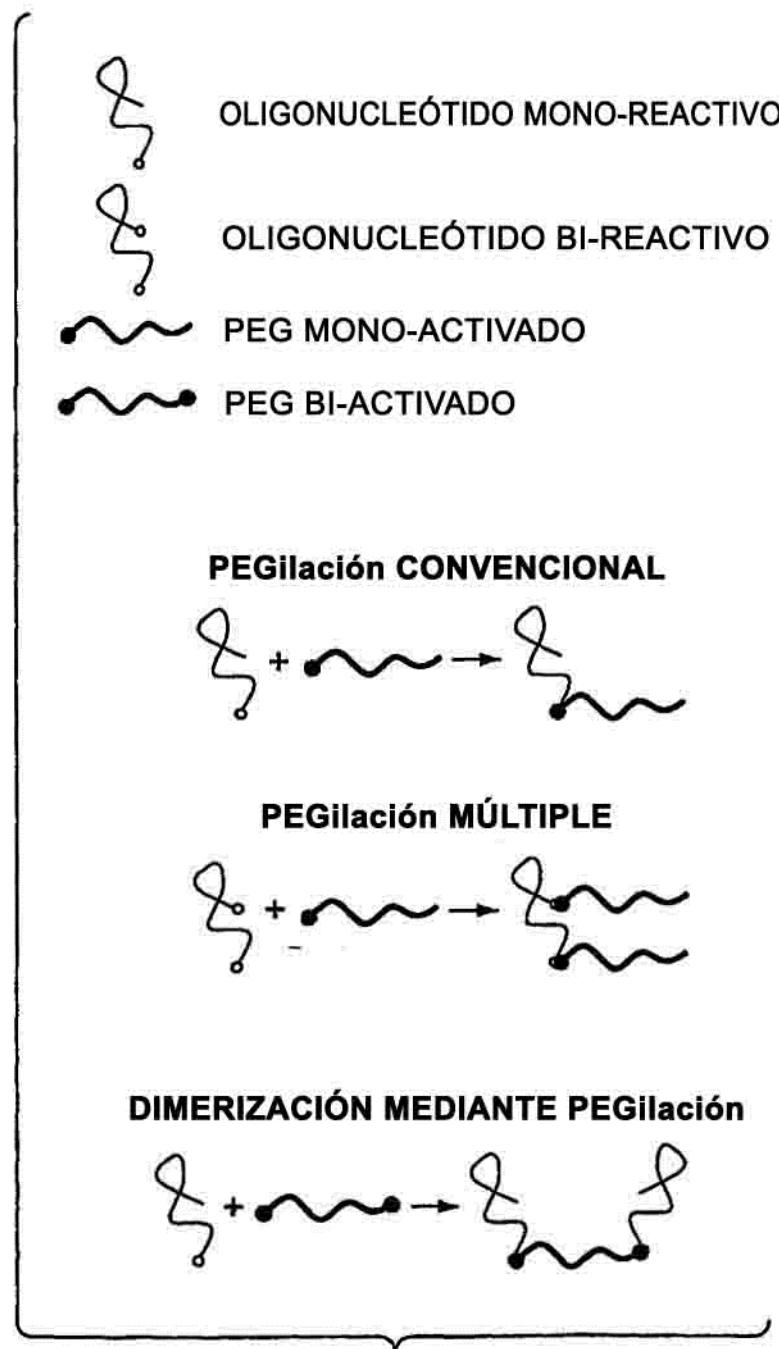


Fig. 6

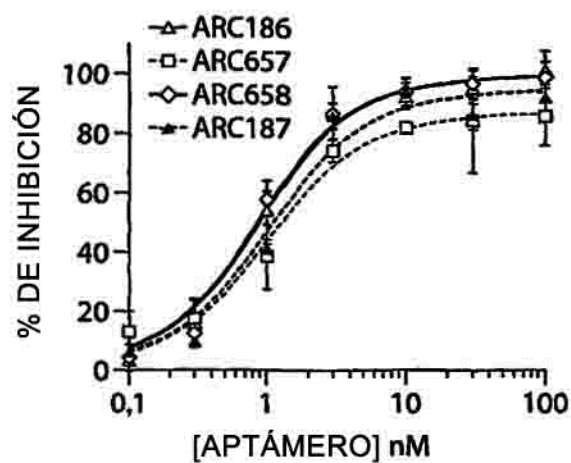


Fig. 7A

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 K	0,6 ± 0,2

Fig. 7B

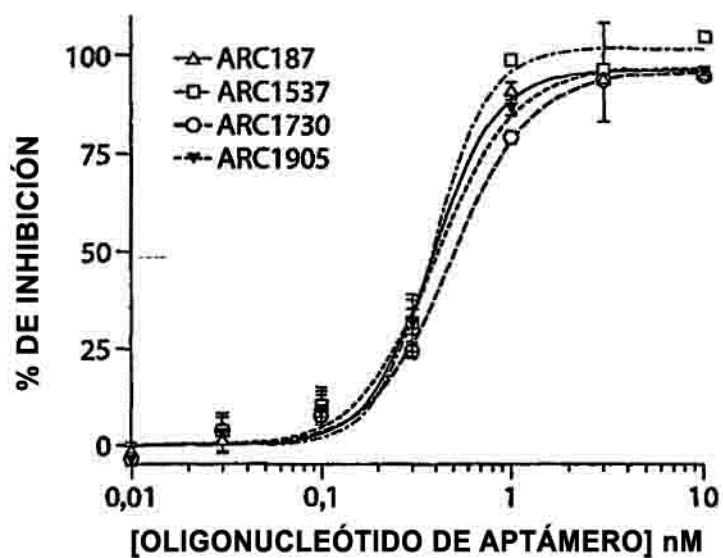


Fig. 7C

ARC#	MODIFICACIÓN CON PEG	CI50 (nM)
187	1,3-BIS-(mPEG)-[20 kDa]- PROPIL-2-(4'-BUTAMIDA) RAMIFICADO DE 40 K	$0,38 \pm 0,03$
1537	LINEAL 40 K	$0,39 \pm 0,06$
1730	2 x LINEAL 20 K	$0,48 \pm 0,04$
1905	2,3-BIS-(mPEG)-[20 kDa]- PROPIL-1-CARBAMOÍLO RAMIFICADO DE 40 K	$0,40 \pm 0,03$

Fig. 7D

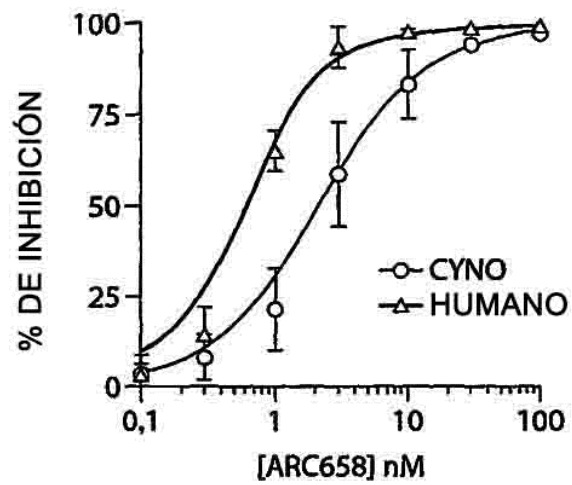


Fig. 8

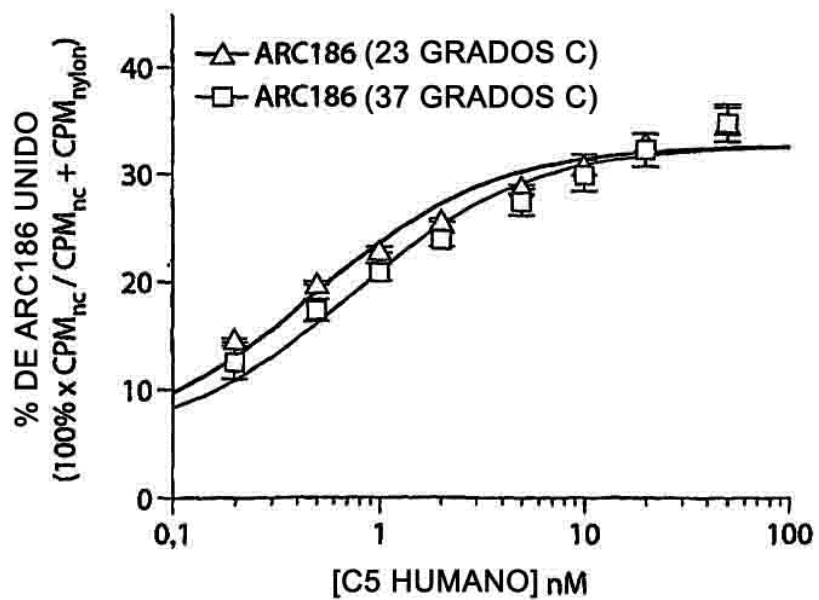


Fig. 9

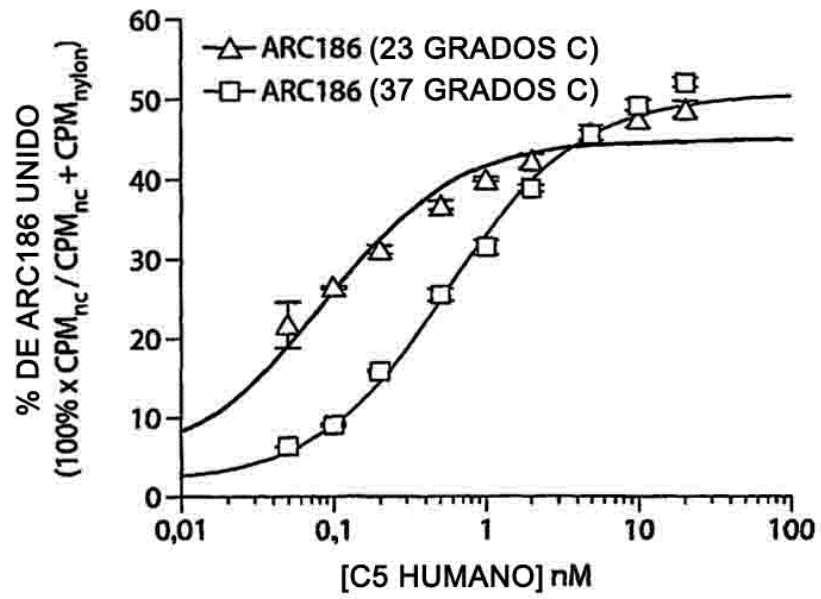


Fig. 10

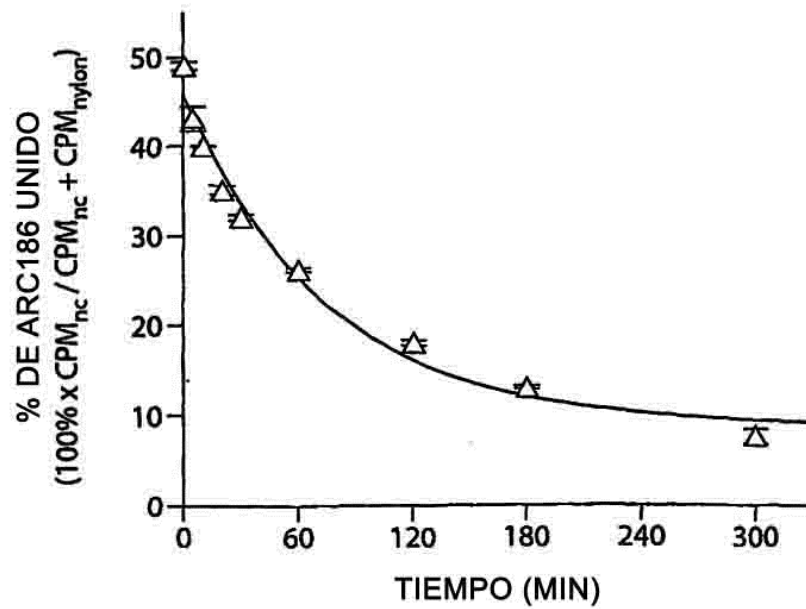


Fig. 11

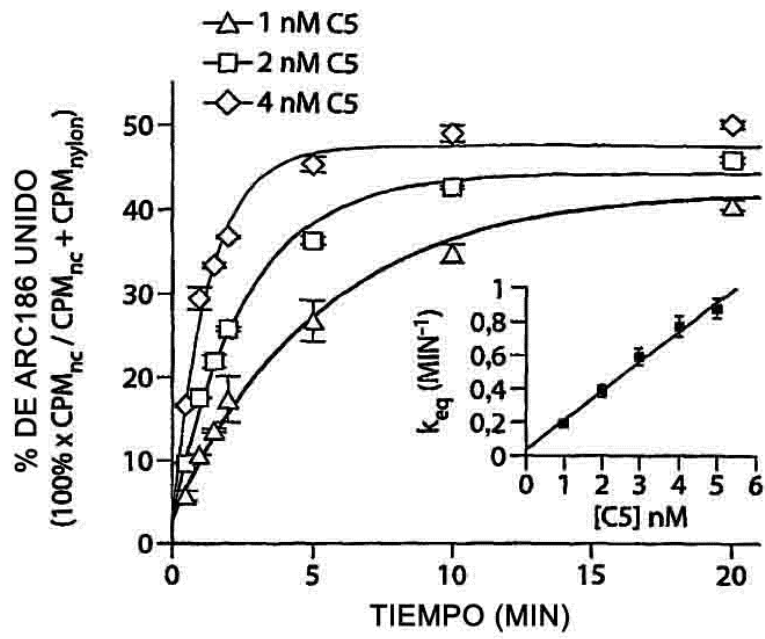


Fig. 12

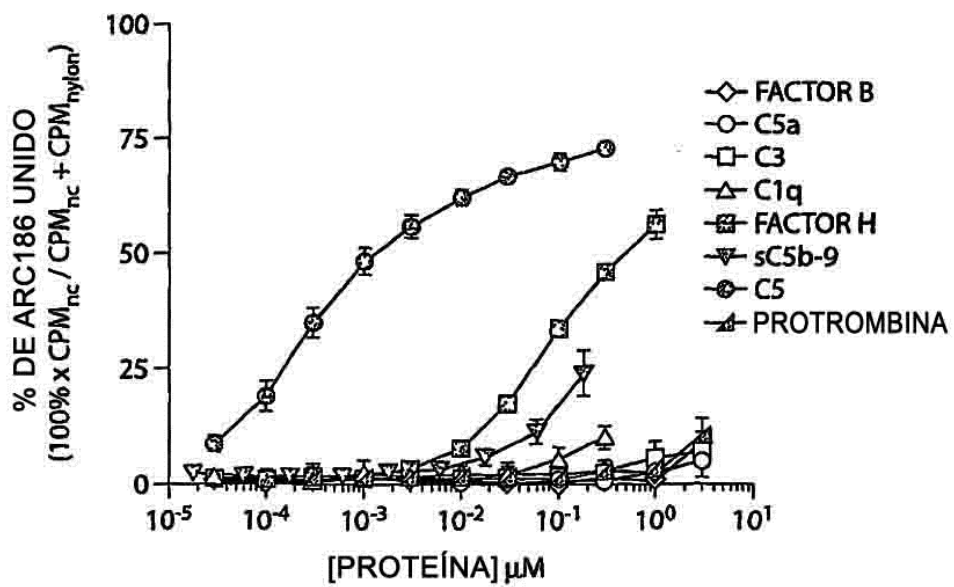


Fig. 13

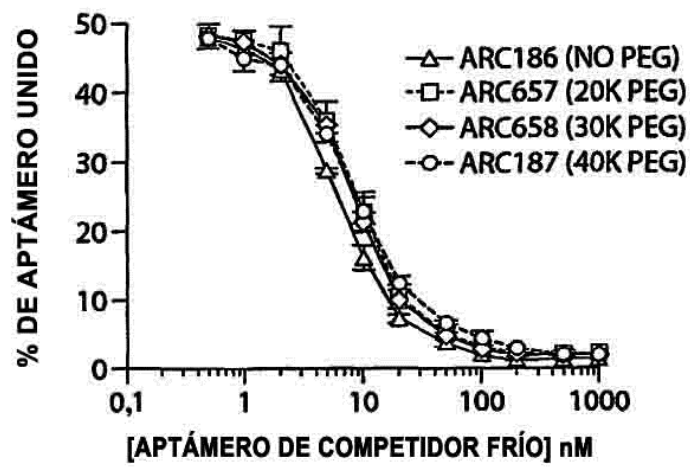


Fig. 14

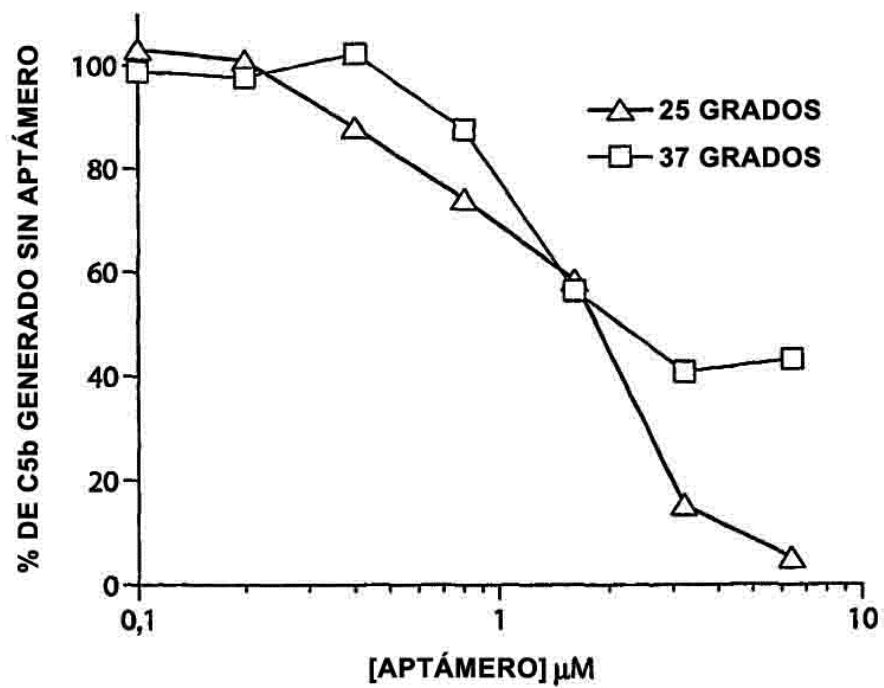


Fig. 15

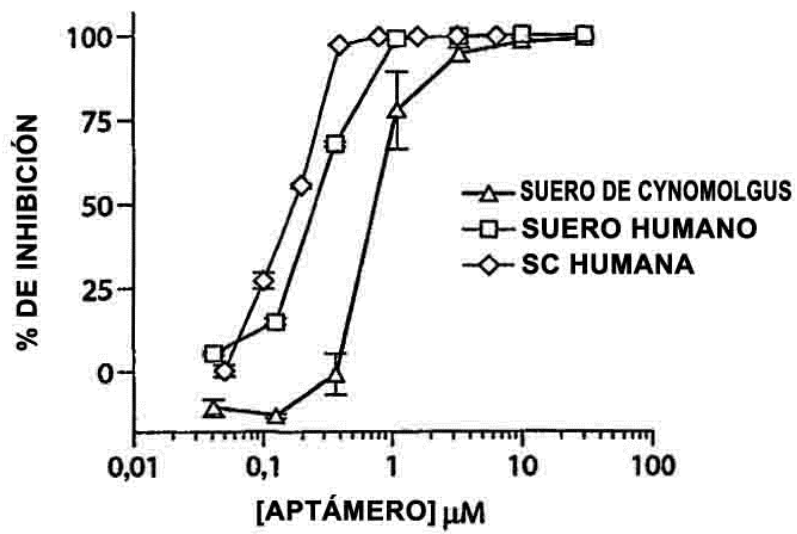


Fig. 16

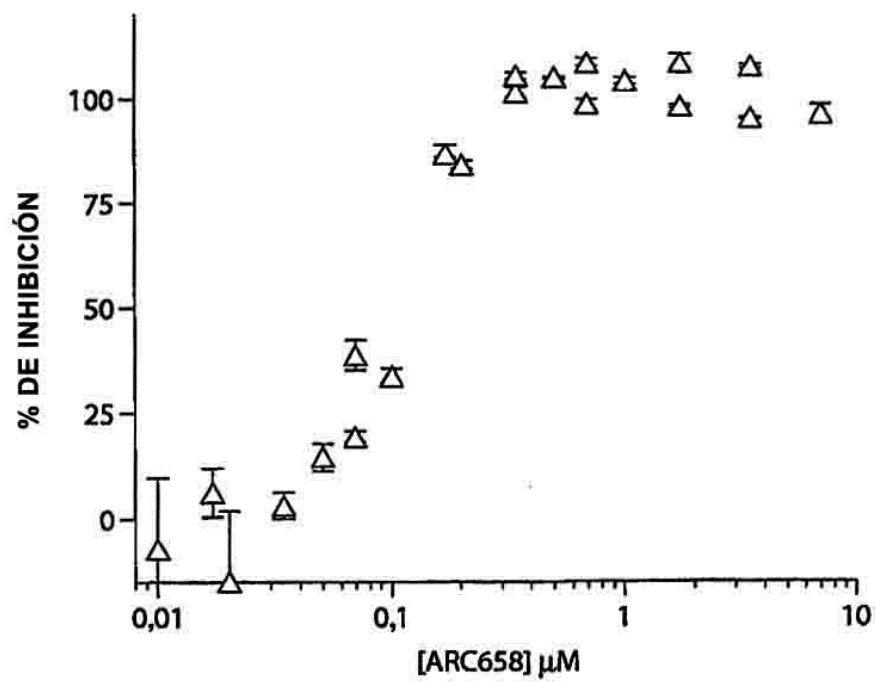


Fig. 17

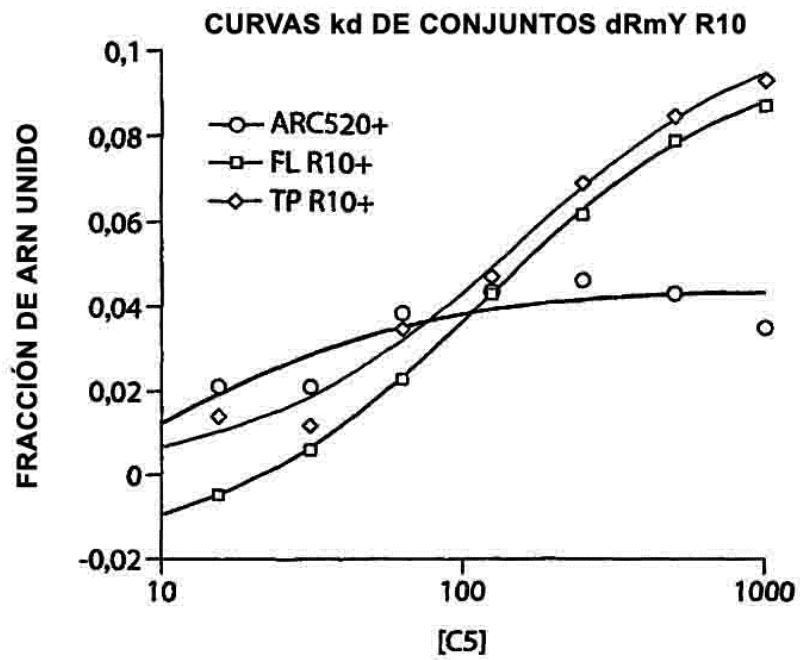


Fig. 18

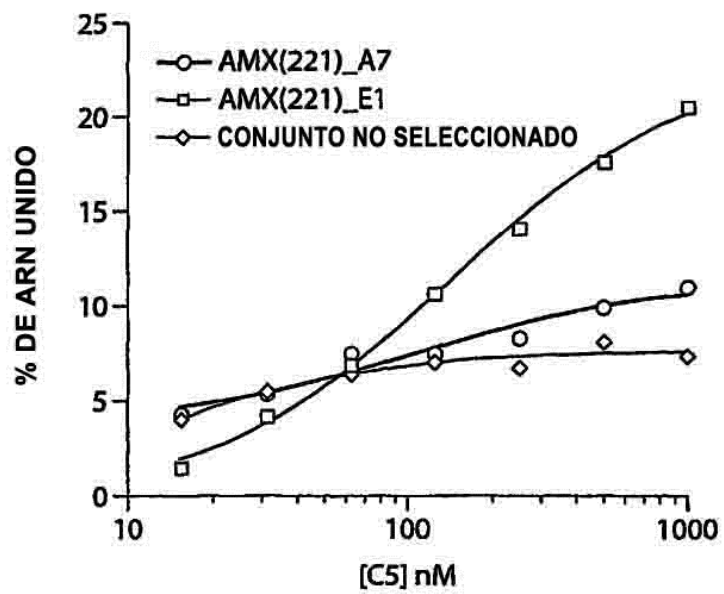


Fig. 19

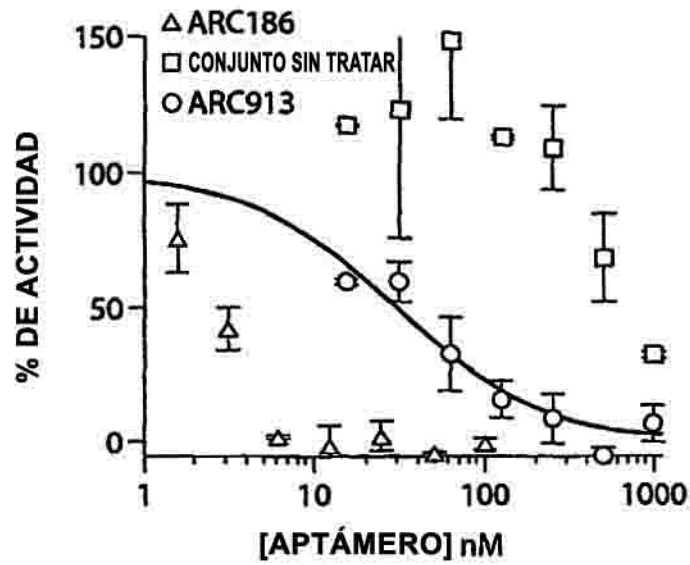


Fig. 20

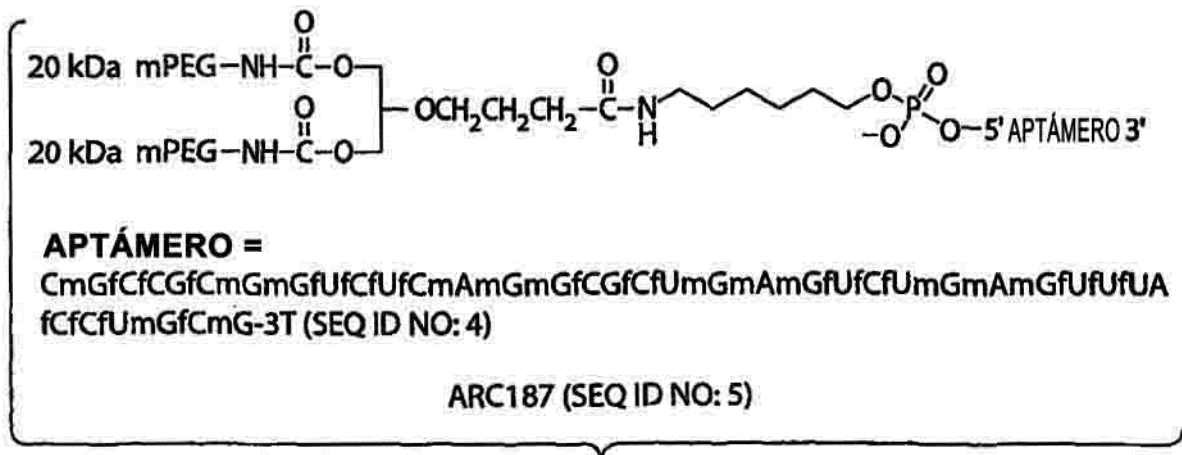


Fig. 21

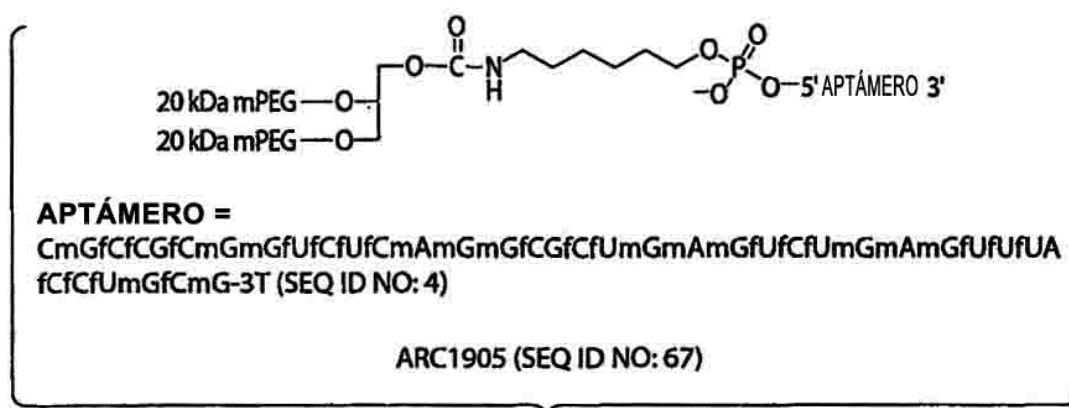


Fig. 22

GRUPO	Nº DE RATONES	ARTÍCULO DE ENSAYO	DOSIS		MEDIDAS
			CONC (nM)	VELOCIDAD DE PERFUSIÓN mL/MIN	
1	5	SIN APTÁMERO	0	3	FRECUENCIA CARDIACA, RITMO, PRESIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA
3	3	APTÁMERO IRRELEVANTE EN UNA PROPORCIÓN MOLAR 50 x	1500	3	FRECUENCIA CARDIACA, RITMO, PRESIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA
4	3	ARC186 EN EQUIVALENCIA MOLAR	30	3	FRECUENCIA CARDIACA, RITMO, PRESIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA
5	5	ARC186 EN UNA PROPORCIÓN MOLAR 10 x	300	3	FRECUENCIA CARDIACA, RITMO, PRESIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA
6	4	ARC186 EN UNA PROPORCIÓN MOLAR 50 x	1500	3	FRECUENCIA CARDIACA, RITMO, PRESIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA

Fig. 23

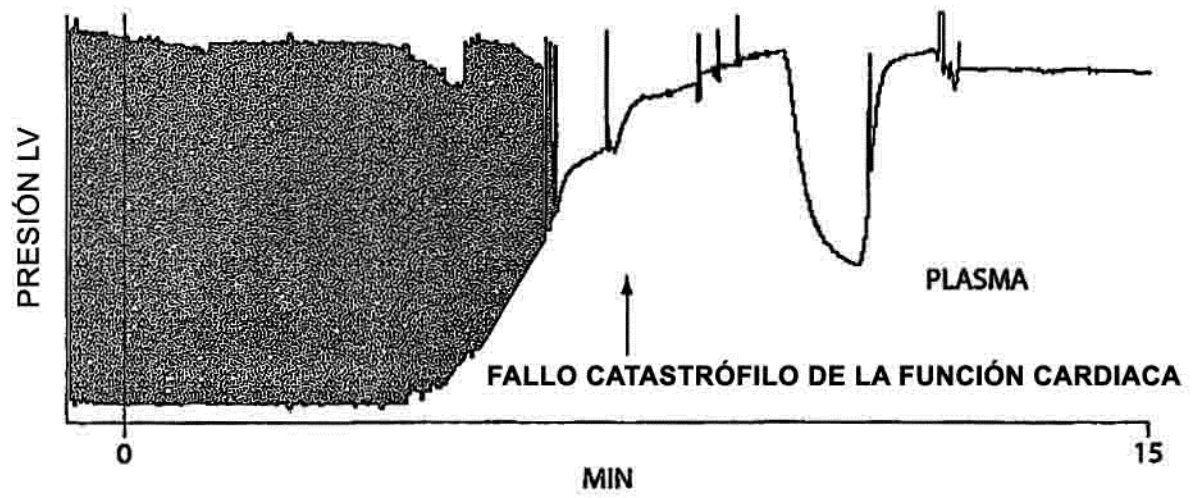


Fig. 24A

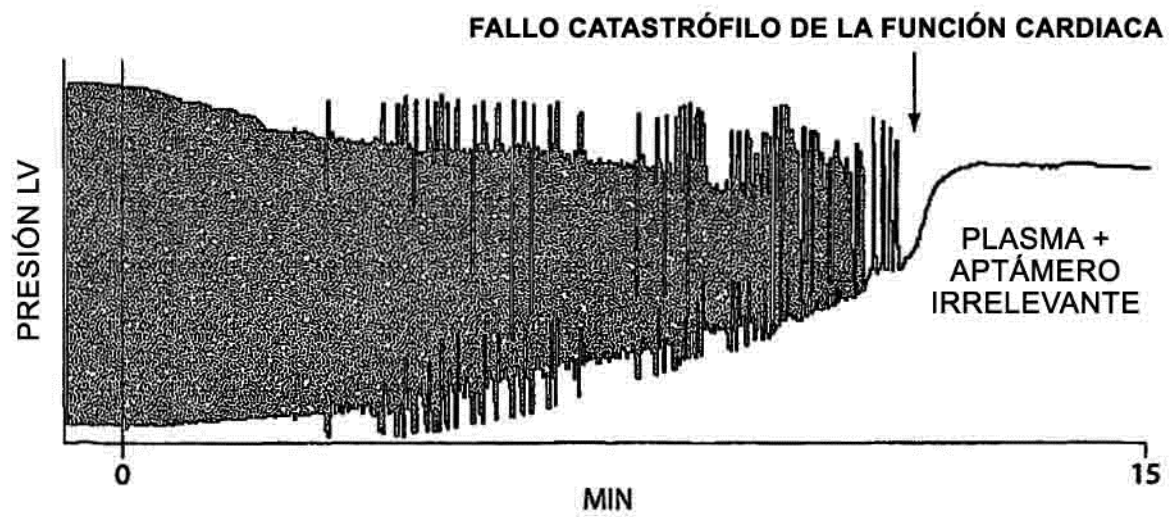


Fig. 24B

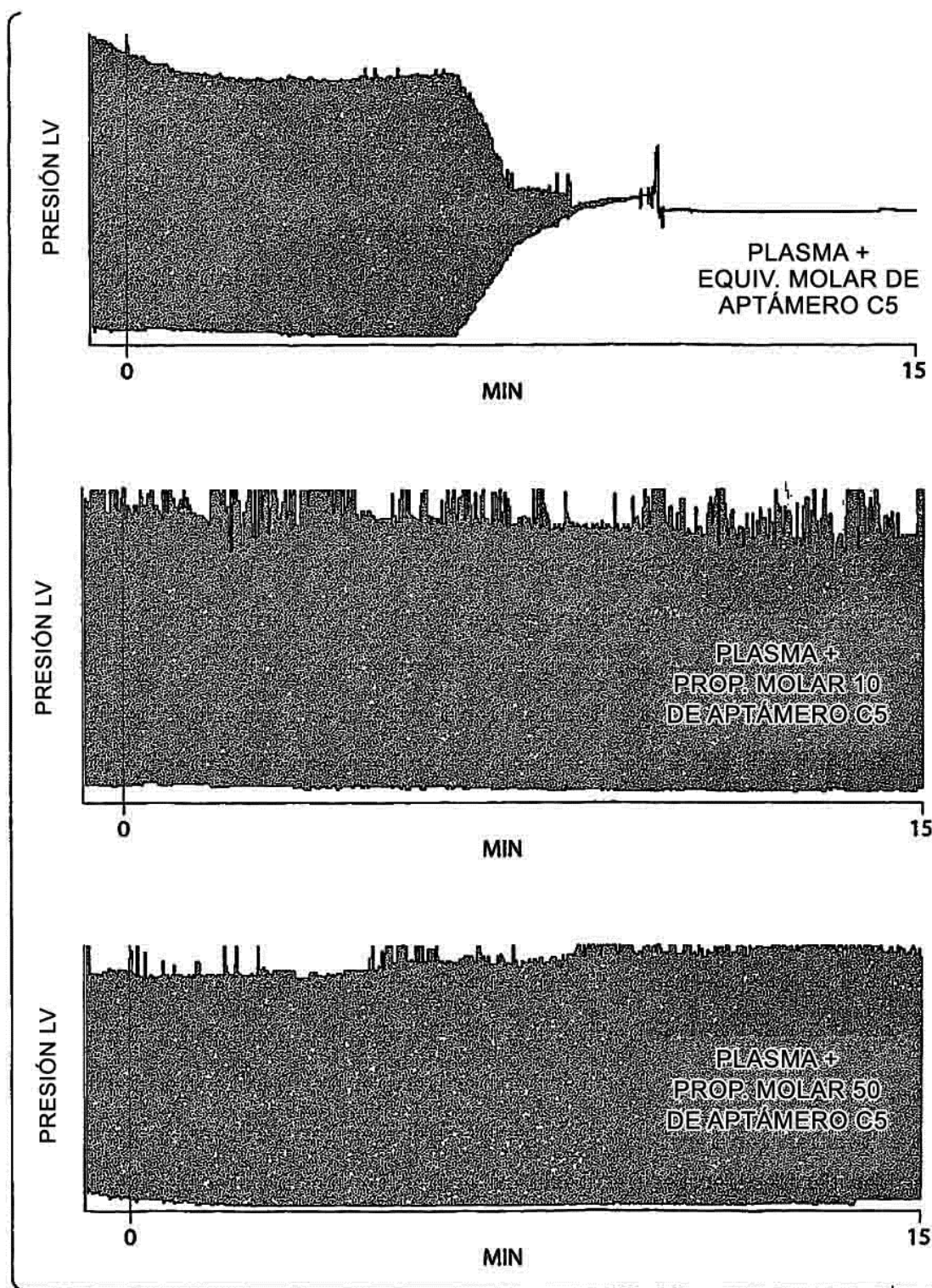


Fig. 25

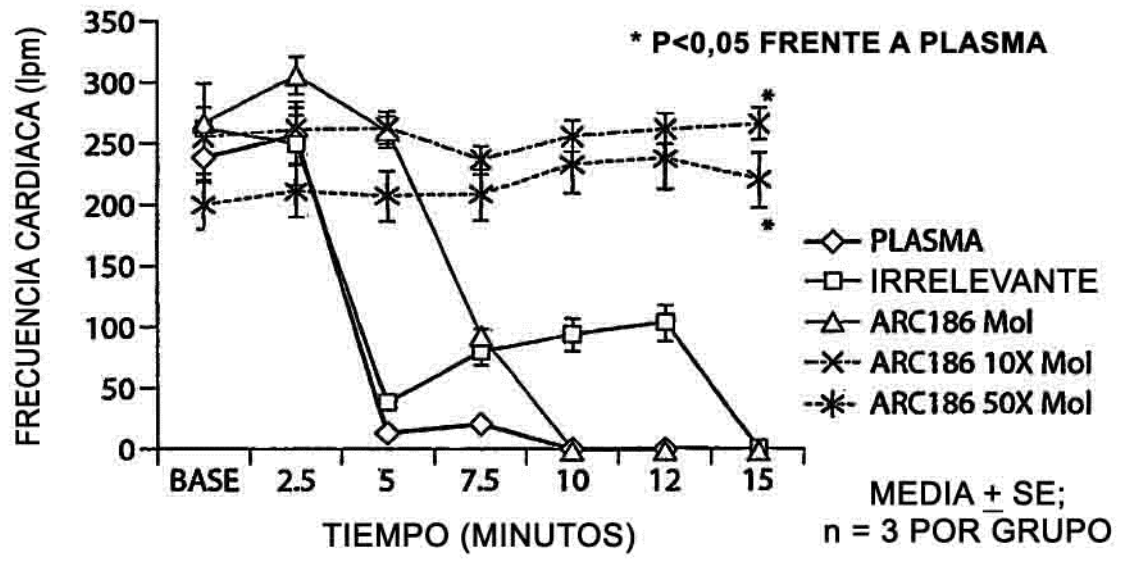


Fig. 26

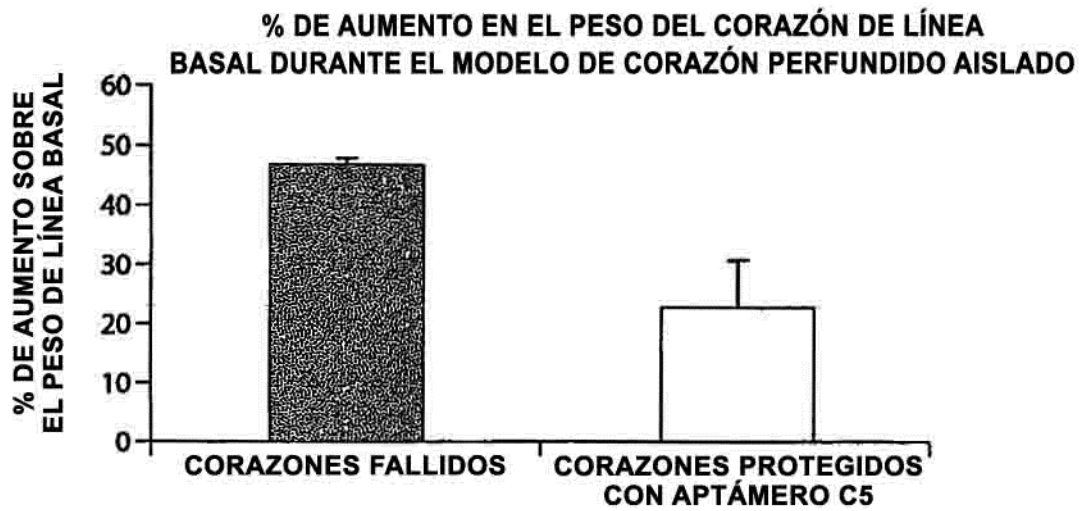


Fig. 27

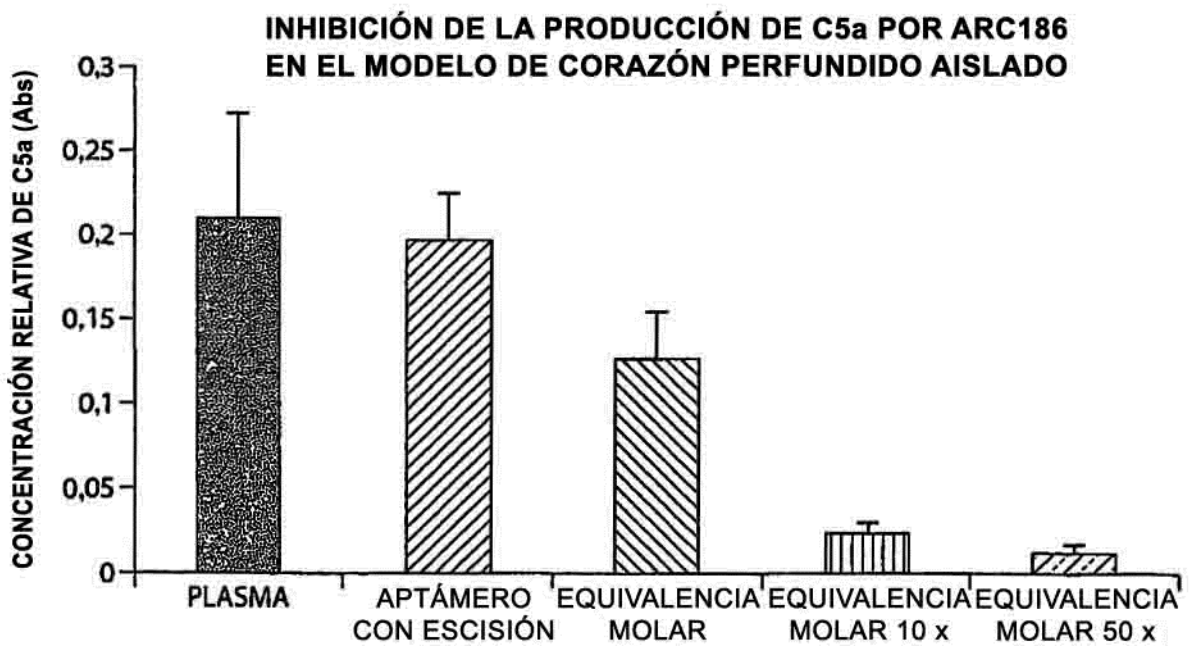


Fig. 28

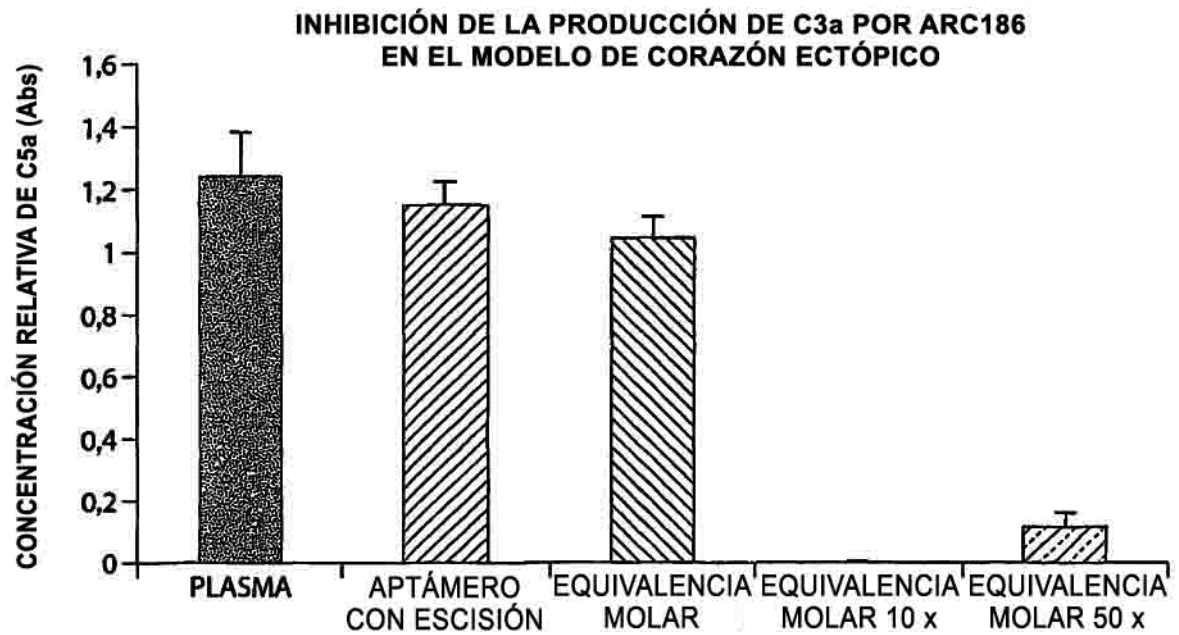


Fig. 29

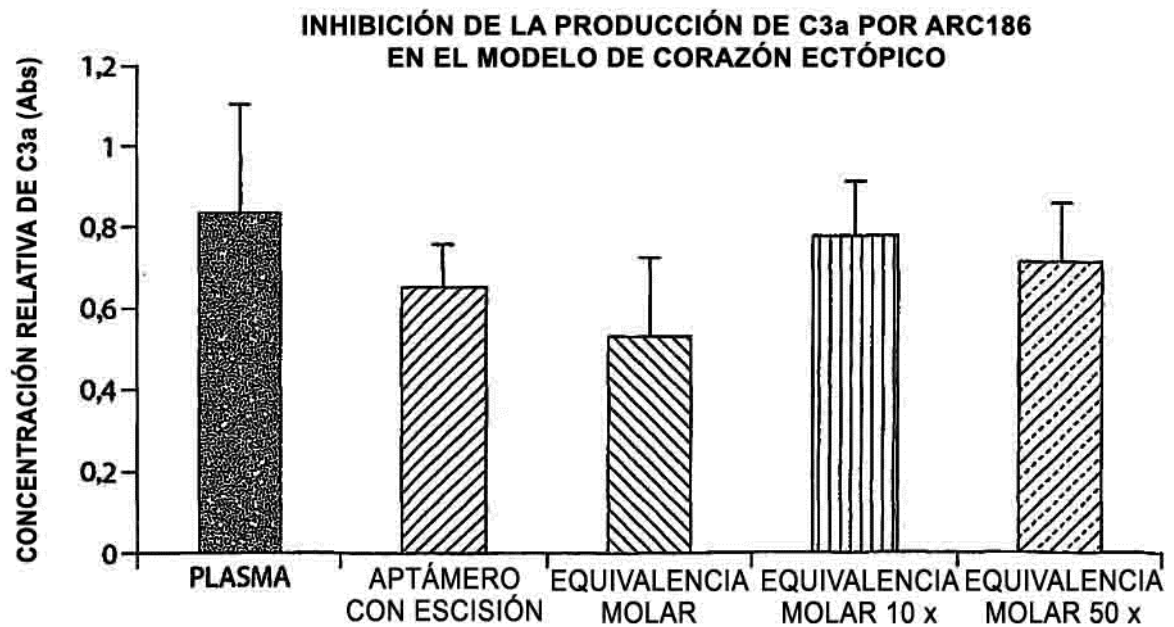


Fig. 30

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 MOLAR 50 x	NEG	POS	POS
3-002	APTÁMERO IRRELEVANTE MOLAR 50 x	NEG	POS	POS
3-003	APTÁMERO IRRELEVANTE MOLAR 50 x	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 10 x	NEG	POS	NEG
5-002	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 10 x	NEG	POS	NEG
5-003	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 10 x	NEG	POS	NEG
5-004	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 10 x	NEG	POS	NEG
5-005	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 10 x	NEG	POS	NEG
6-001	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 50 x	NEG	POS	NEG
6-002	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 50 x	NEG	POS	NEG
6-003	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 50 x	NEG	POS	NEG
6-004	APTÁMERO C5 EQUIVALENCIA MOLAR 50 x	NEG	POS	NEG

Fig. 31

ANIMAL	COMPUESTO	SUERO	PROPORCIONAR MOLAR	AUMENTO DE EDP	FALLO (S O N)	TIEMPO HASTA EL FALLO
1-001	ARC658	HUMANO	0	S	S	4 MIN 30 S
1-002	ARC658	HUMANO	0	S	S	4 MIN 38 S
1-003	ARC658	HUMANO	0	S	S	3 MIN 20 S
1-004	ARC658	HUMANO	0	S	S	12 MIN 24 S
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

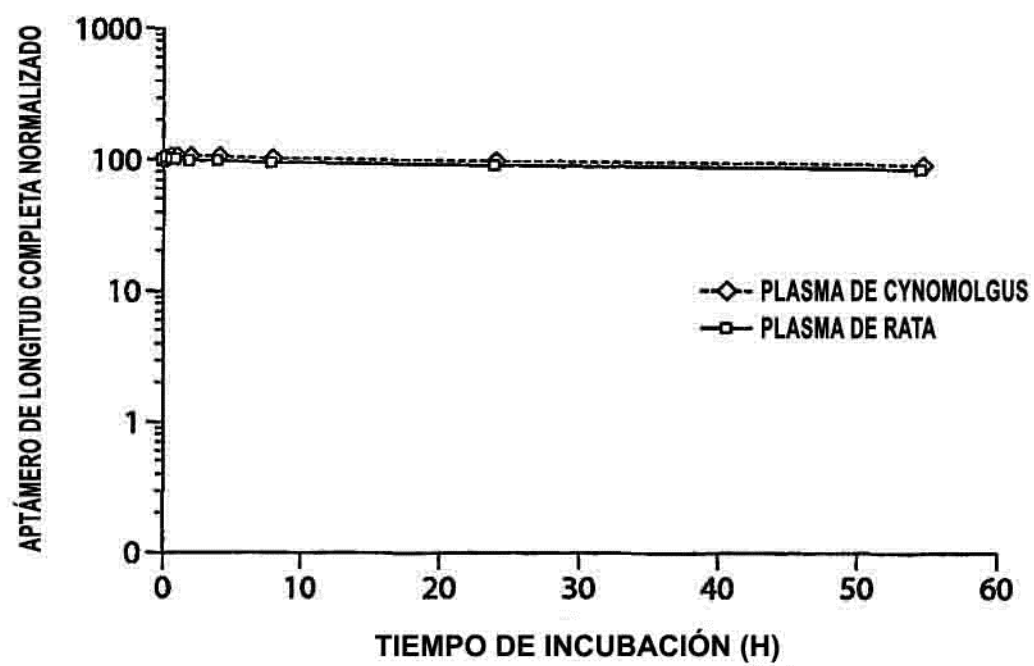


Fig. 33

GRUPO NÚMERO	NÚMERO DE ANIMALES	ARTÍCULO DE PRUEBA	NIVEL DE DOSIFICACIÓN (mg/kg)	VOLUMEN DE DOSIFICACIÓN (mL/kg)	RÉGIMEN DE DOSIFICACIÓN	RECOGIDA DE MUESTRA
1	3	ARC657 20 kDa PEG	10	1	BOLO INTRAVENOSO EL DÍA 1	t=PRE-DOSIS, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 HRS
2	3	ARC658 30 kDa PEG	10	1	BOLO INTRAVENOSO EL DÍA 1	t=PRE-DOSIS, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 HRS
3	3	ARC187 40 kDa PEG	10	1	BOLO INTRAVENOSO EL DÍA 1	t=PRE-DOSIS, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 HRS

Fig. 34

PK CONJUGADOS DE APTÁMERO-PEG ANTI-C5 EN RATA SPRAGUE-DAWLEY						
APTÁMERO	ARC657		ARC658		ARC187	
GRUPO PEG	20 kDa		30 kDa		40 kDa	
	MEDIA	STDEV	MEDIA	STDEV	MEDIA	STDEV
TIEMPO(HRS)	Cp (µM)	Cp (µM)	Cp (µM)	Cp (µM)	Cp (µM)	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

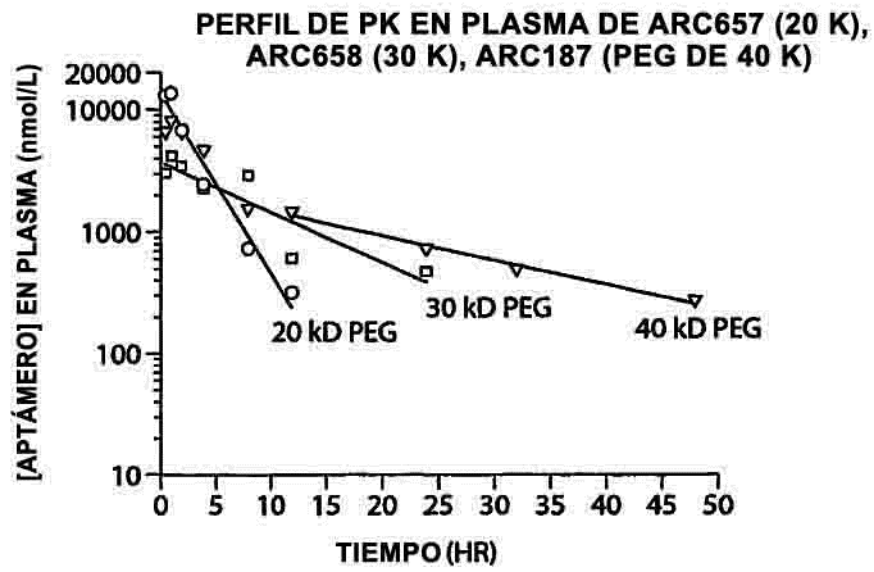


Fig. 36

ESPECIE	DOSIS (mg/kg)	RUTA DE ADMIN.	GRUPO PEG	C_{max} (μ g/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (μ g $\cdot$ hr/mL)	$t_{1/2} (\alpha)$ (HR)	$t_{1/2} (\beta)$ (HR)	Cl (mL/min $\cdot$ 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

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

Fig. 38A

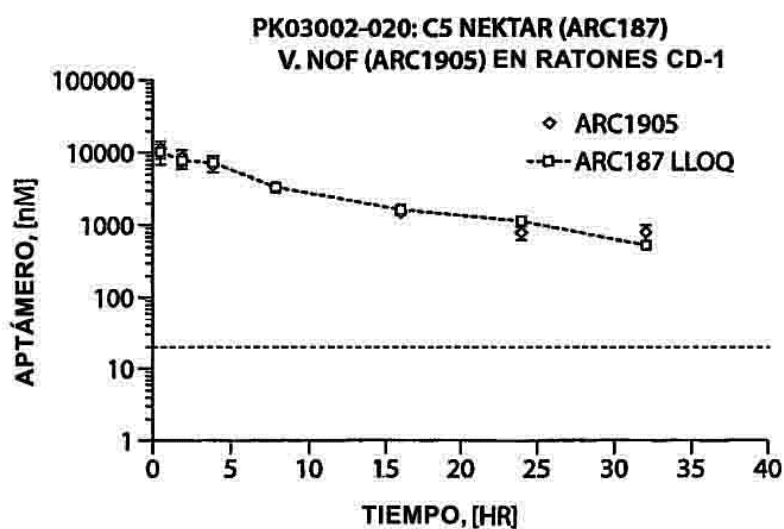


Fig. 38B

ANÁLISIS DE PK NO COMPARTIMENTADO			
ATRIBUTO	UNIDAD	ARC1905	ARC187
C _{max}	μM	12	10
AUC _{0-∞}	μM-HR	88	89
MRT _{0-∞}	HR	11	11
CL	mL/min. kg	0,15	0,15
V _{ss}	mL/kg	95	96
K ₁₀	1/HR	0,151	0,121
t _{1/2} (K ₁₀)	HR	5	6

Fig. 38C

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

Fig. 39

GRUPO NÚMERO	NÚMERO DE ANIMALES	ARTÍCULO DE ENSAYO	NIVEL DE DOSIFICACIÓN (mg/kg)	VOLUMEN DE DOSIFICACIÓN (mL/kg)	RÉGIMEN DE DOSIFICACIÓN	RECOGIDA DE MUESTRA
1	1	ARC657 20 kDa PEG	30	3	BOLO INTRAVENOSO EL DÍA 1	t = PRE-DOSIS 1, 5, 10, 15 Y 30 MINUTOS EN 1, 2, 4, 6, 8, 12 24, 48, 72, 96 Y 172 HORAS
2	1	ARC658 30 kDa PEG	30	3	BOLO INTRAVENOSO EL DÍA 1	t = PRE-DOSIS 1, 5, 10, 15 Y 30 MINUTOS EN 1, 2, 4, 6, 8, 12 24, 48, 72, 96 Y 172 HORAS
3	1	ARC187 40 kDa PEG	30	3	BOLO INTRAVENOSO EL DÍA 1	t = PRE-DOSIS 1, 5, 10, 15 Y 30 MINUTOS EN 1, 2, 4, 6, 8, 12 24, 48, 72, 96 Y 172 HORAS

Fig. 40

PK DE CONJUGADOS DE APTÁMERO-PEG ANTI-C5 EN MACACO CYNOMOLGUS			
APTÁMERO	ARC657	ARC658	ARC187
GRUPO PEG	20 kDa	30 kDa	40 kDa
	MEDIA	MEDIA	MEDIA
TIEMPO (HRS)	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

ESPECIES	DOSIS (mg/kg)	RUTA DE ADMIN.	GRUPO PEG	C _{max} (µg/ml)	ABC _{0-∞} (µg_hr/mL)	t _{1/2} (α) (HR)	t _{1/2} (β) (HR)	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

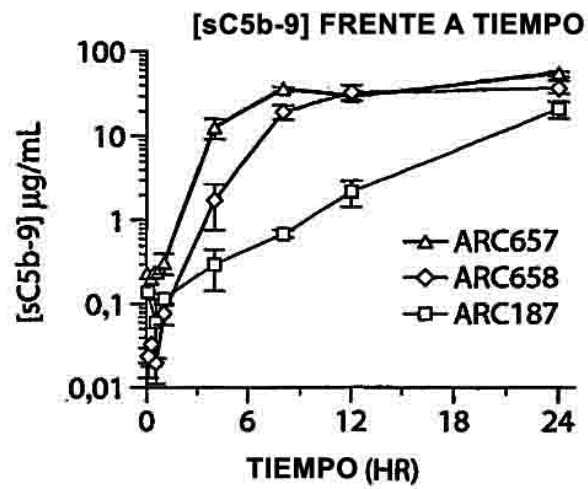


Fig. 43A

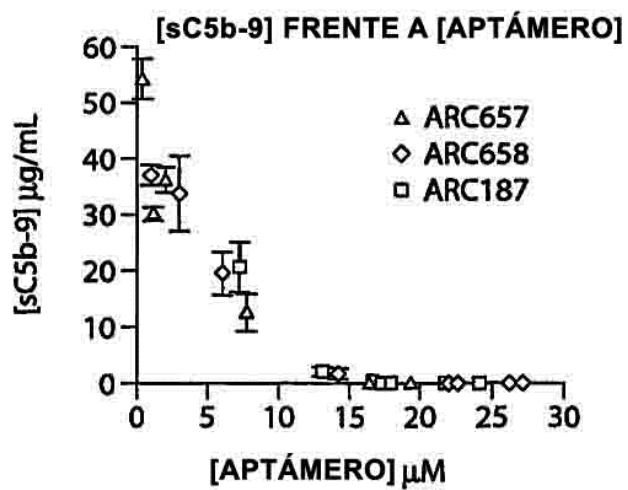


Fig. 43B

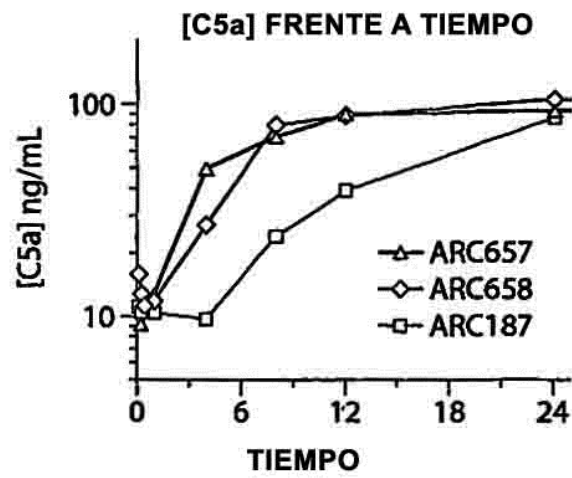


Fig. 43C

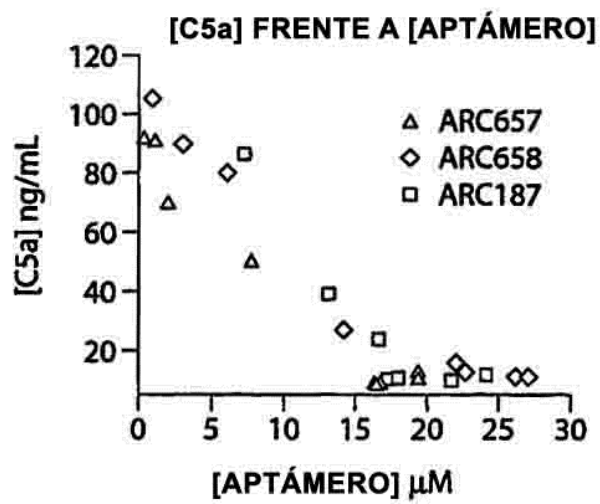


Fig. 43D

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

Fig. 44

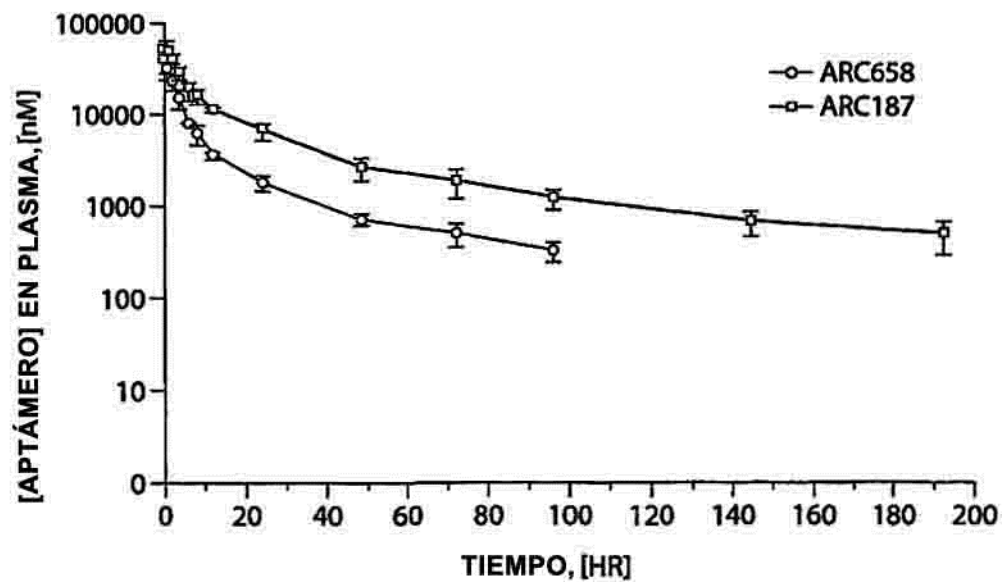


Fig. 45

ESPECIE	DOSIS (mg/kg)	RUTA DE ADMIN.	GRUPO PEG	C _{máx} (μM)	ABC _{0-∞} (μg_hr/mL)	t _{1/2} (α) (HR)	t _{1/2} (β) (HR)	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

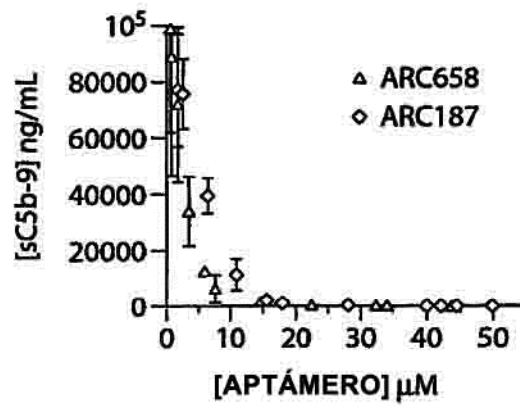


Fig. 47

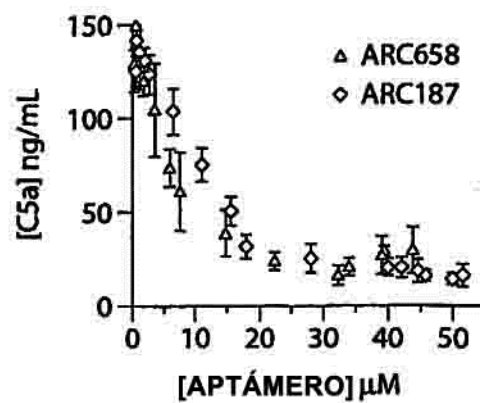


Fig. 48

GRUPO NÚMERO	NÚMERO DE ANIMALES	ARTÍCULO DE ENSAYO	NIVEL DE DOSIFICACIÓN (mg/kg)	DOSE CONC. (mg/mL)	VOLUMEN DE DOSIFICACIÓN (mL/kg)	RÉGIMEN DE DOSIFICACIÓN	ÚLTIMO DÍA DE LA PRUEBA
1	3	ARC187	1mg/kg DE BOLO IV Y 0,0013 mg/kg/min DE INFUSIÓN IV	10	0,1 mL/kg DE BOLO IV Y 0,1872 mL/kg/día DE INFUSIÓN IV	BOLO IV E INFUSIÓN DE 48 HORAS EL DÍA 1	DÍA 8

Fig. 49

ESPECIES	DOSIS (mg/kg)	RUTA DE ADMIN.	GRUPO PEG	C _{máx} (µg/mL)	ABC _{0-∞} (µg_hr/mL)	t _{1/2} (α) (HR)	t _{1/2} (β) (HR)	Cl (mL/min_kg)	V _{ss} (mL/kg)
PRIMATE	30	IV	40 kD	610	8061	4.48	53.13	0.06	168

Fig. 50

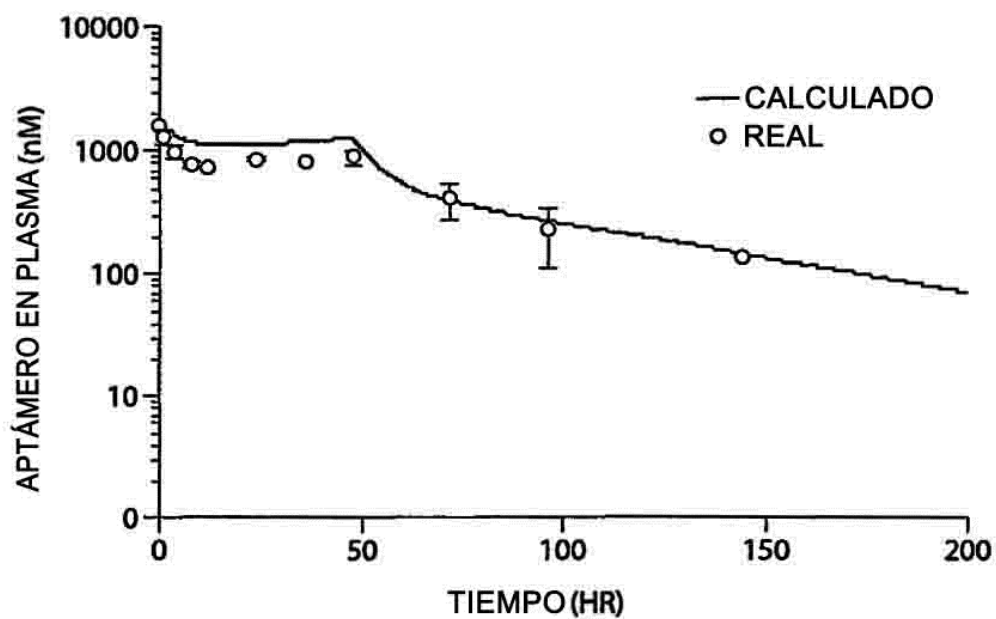


Fig. 51

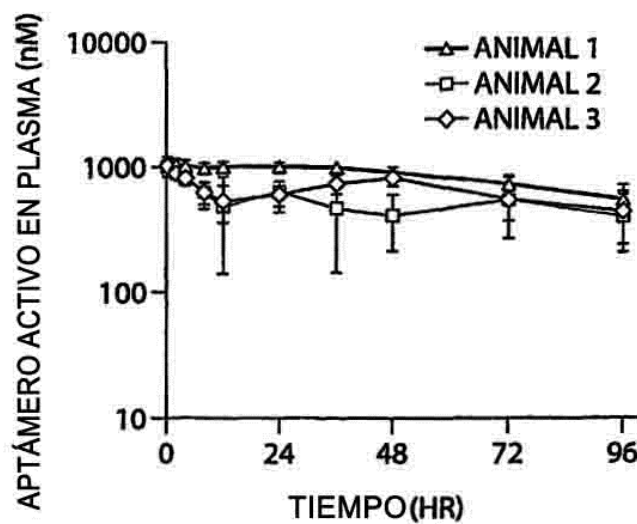


Fig. 52

APTÁMERO	GRUPO PEG	P. MOL. (OLIGO)	P. MOL. (TOTAL)	$t_{1/2}(\alpha)$ (HR)	$t_{1/2}(\beta)$ (HR)	DOSIS (OLIGO) TOTAL PARA 1,5 μM (g)
ARC187	40 kDa	12,703	52,703	4.48	53.13	0.40

Fig. 53

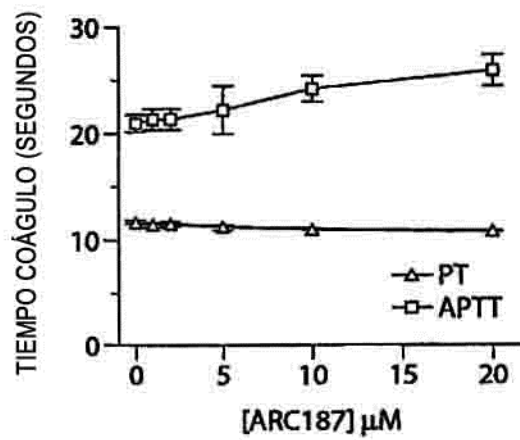


Fig. 54

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 & ARC187	nd	618 ± 55	492 ± 28
+ HEPARINA & PROTAMINA	160 ± 11	155 ± 6	159 ± 9
+ HEPARINA, PROTAMINA & ARC187	200 ± 5	172 ± 1	169 ± 8

^a5 U/mL HEPARINA; ^b4 U/mL HEPARINA; nd, NO DETERMINADO

Fig. 55

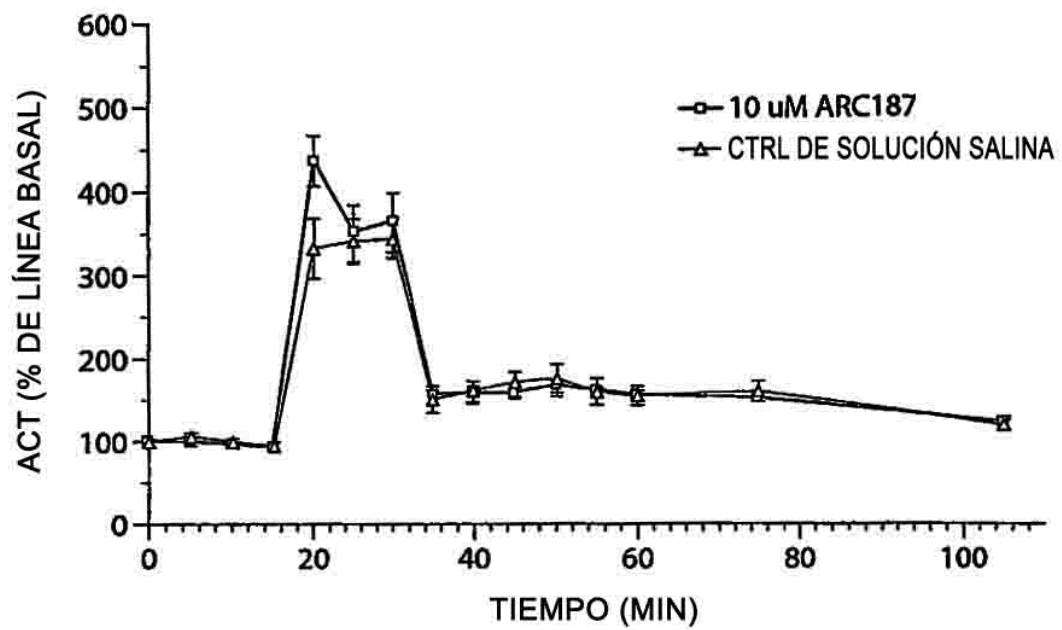


Fig. 56

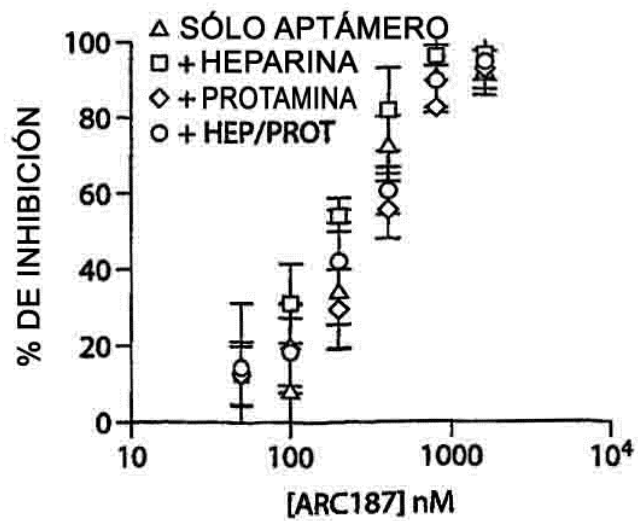


Fig. 57