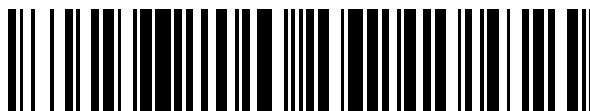


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 423**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/115** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2007 E 12173138 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2596807**

54 Título: **Aptámeros de unión a complemento y agentes anti-C5 útiles para el tratamiento de trastornos oculares**

30 Prioridad:

**08.03.2006 US 780905 P**

**29.09.2006 US 848274 P**

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

**04.03.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**EPSTEIN, DAVID y  
KURZ, JEFFREY C.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 562 423 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Aptámeros de unión a complemento y agentes anti-C5 útiles para el tratamiento de trastornos oculares

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general al campo de los ácidos nucleicos, y más particularmente a aptámeros capaces de unirse a las proteínas del sistema de complemento, útiles como agentes terapéuticos y diagnósticos en trastornos oftalmológicos relacionados con el complemento o trastornos en los que, especialmente, se ha implicado la activación del complemento mediada por C5. En realizaciones preferidas, la invención se refiere más específicamente a métodos y materiales para el tratamiento de DMAE de tipo exudativo y la detección de DMAE de tipo no exudativo. La divulgación se refiere además a materiales y métodos para la administración de aptámeros capaces de unirse a proteínas del sistema de complemento incluyendo proteínas C5.

15 **Antecedentes de la invención**

Un aptámero, por definición, es una molécula de ácido nucleico aislado que se une con elevada especificidad y afinidad a alguna diana, tal como una proteína, mediante interacciones distintas al emparejamiento de bases de Watson-Crick. Aunque los aptámeros son moléculas basadas en ácidos nucleicos, hay una diferencia fundamental entre los aptámeros y otras moléculas de ácidos nucleicos, tales como genes y ARNm. En los últimos, la estructura de ácido nucleico codifica información a través de su secuencia lineal de bases y por lo tanto, esta secuencia es de importancia para la función de almacenamiento de la información. Por el contrario, la función del aptámero, que se basa en la unión específica de una molécula diana, no depende de una secuencia lineal de bases conservada, sino en una estructura secundaria/terciaria particular. Esto es, los aptámeros son secuencias no codificantes. Cualquier potencial de codificación que pueda poseer un aptámero es completamente fortuito y no juega absolutamente ningún papel en la unión de un aptámero a su diana afin. Por tanto, aunque puede haber aptámeros que se unan a la misma diana, e incluso al mismo sitio de la diana, compartiendo una secuencia lineal de bases similares, la mayoría no.

Los aptámeros también tienen que diferenciarse de las secuencias de ácidos nucleicos de origen natural que se unen a determinadas proteínas. Estas últimas secuencias son secuencias de origen natural embebidas dentro del genoma de los organismos que se unen a subgrupos de proteínas especializadas que están involucradas en la transcripción, traducción y transporte de ácidos nucleicos de origen natural, es decir, proteínas de unión a ácidos nucleicos. Por otro lado, los aptámeros son moléculas de ácido nucleico cortas, aisladas de origen no natural. Aunque pueden identificarse aptámeros que se unen a proteínas de unión a ácidos nucleicos, en la mayoría de los casos dichos aptámeros tienen poca o ninguna identidad de secuencia con las secuencias reconocidas por las proteínas de unión a ácido nucleico en la naturaleza. De manera más importante, los aptámeros pueden unirse virtualmente a cualquier proteína (no solo a proteínas de unión a ácido nucleico) así como a cualquier diana de interés, incluyendo moléculas pequeñas, hidratos de carbono, péptidos, etc. Para la mayoría de las dianas, incluso proteínas, no existe una secuencia de origen natural a la que se une; para aquellas secuencias que tienen dicha secuencia, es decir, proteínas de unión a ácidos nucleicos, dichas secuencias diferirán de los aptámeros como resultado de la relativamente baja afinidad de unión usada en la naturaleza en comparación con aptámeros de unión estrecha.

Los aptámeros, como los péptidos generados mediante presentación de fagos o anticuerpos, son capaces de unirse específicamente a dianas seleccionadas y modular la actividad de la diana o las interacciones de unión, por ejemplo, mediante la unión de aptámeros puede bloquearse la capacidad de funcionar de su diana. Como con los anticuerpos, esta propiedad funcional o unión específica a una diana, es una propiedad inherente. También como con los anticuerpos, aunque el experto en la materia puede conocer las características estructurales precisas que tendrá un aptámero, el experto en la materia sabe cómo identificar, preparar y usar dicha molécula en ausencia de una definición estructural precisa.

Los aptámeros también son análogos o a agentes terapéuticos de molécula pequeña en que un solo cambio estructural, aunque parezca menor, puede afectar de manera dramática (en varios órdenes de magnitud) a la unión y/u otra actividad (o actividades) del aptámero. Por otra parte, algunos cambios estructurales tendrán poco o ningún efecto en absoluto. Esto es el resultado de la importancia de la estructura secundaria/terciaria de los aptámeros. En otras palabras, un aptámero es una estructura tridimensional sujeta en una conformación fija que proporciona contactos químicos para unirse específicamente a su diana específica. En consecuencia, (1) algunas áreas o secuencias particulares son esenciales como (a) puntos específicos de contacto con la diana, y/o como (b) secuencias que posicionen las moléculas en contacto con la diana; (2) algunas áreas o secuencias particulares tienen un intervalo de variabilidad, por ejemplo, el nucleótido X tiene que ser una pirimidina, o el nucleótido Y tiene que ser una purina, o los nucleótidos X e Y tiene que ser complementarios; y (3) algunas áreas o secuencias particulares pueden ser cualquier cosa, es decir, son esencialmente elementos espaciadores, por ejemplo, pueden ser cualquier cadena de nucleótidos de una longitud dada o incluso un espaciador no nucleotídico, tal como una molécula de PEG.

- Descubiertos por un proceso de selección *in vitro* de grupos de oligonucleótidos de secuencia al azar, se ha generado aptámeros para más de 130 proteínas, incluyendo factores de crecimiento, factores de transcripción, enzimas, inmunoglobulinas, y receptores. Un aptámero típico tiene un tamaño de 10-15 kDa (20-45 nucleótidos), se une a su diana con afinidad nanomolar o sub-nanomolar, y discrimina entre dianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, los aptámeros no se unirán generalmente a otras proteínas de la misma familia de genes). Una serie de estudios estructurales han demostrado que los aptámeros son capaces de usar los mismos tipos de interacciones de unión (por ejemplo, puentes de hidrógeno, complementariedades electrostáticas, contactos hidrófobos, exclusión estérica) que dirigen la afinidad y especificidad en complejos anticuerpo-antígeno.
- Los aptámeros tienen un número de características deseables para su uso como agentes terapéuticos y diagnósticos incluyendo elevada especificidad y afinidad, eficacia biológica, y excelentes propiedades farmacocinéticas. Además, ofrecen ventajas competitivas específicas por encima de anticuerpos y otras proteínas biológicas, por ejemplo:
- 1) Velocidad y control. Los aptámeros se producen enteramente en un proceso *in vitro*, permitiendo la generación rápida de líderes iniciales, incluyendo líderes terapéuticos. La selección *in vitro* permite controlar de manera estrecha la especificidad y afinidad del aptámero y permite la generación de líderes, incluyendo líderes contra dianas tanto tóxicas como no inmunogénicas.
  - 2) Toxicidad e inmunogenicidad. Los aptámeros como clase han demostrado una toxicidad terapéuticamente aceptable y carecen de inmunogenicidad. Mientras que la eficacia de muchos anticuerpos monoclonales puede limitarse fuertemente por la respuesta inmune a los propios anticuerpos, es extremadamente difícil suscitar anticuerpos contra aptámeros, lo más probablemente debido a que los aptámeros no pueden presentarse a linfocitos T mediante el CMH y a que la respuesta inmune está generalmente entrenada para no reconocer fragmentos de ácidos nucleicos.
  - 3) Administración. Mientras que la mayoría de los agentes terapéuticos de anticuerpos se administran mediante infusión intravenosa (normalmente durante 2-4 horas), los aptámeros pueden administrarse mediante inyección subcutánea (la biodisponibilidad de los aptámeros mediante administración subcutánea es > 80 % en los estudios en monos (Tucker et al., J. Chromatography B. 732: 203-212, 1999)). Esta diferencia se debe principalmente a la solubilidad comparativamente baja y por tanto a los grandes volúmenes necesarios para la mayor parte de los Acm terapéuticos. Con buena solubilidad (>150 mg/ml) y un peso molecular comparativamente bajo (aptámero: 10-50 kDa; anticuerpo: 150 kDa), una dosis semanal de aptámero puede administrarse mediante inyección en un volumen de menos de 0,5 ml. Además, el pequeño tamaño de los aptámeros les permite penetrar en zonas de constricciones conformacionales que no permiten penetrar a los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, lo que supone otra ventaja más de los agentes terapéuticos o profilácticos basados en aptámeros.
  - 4) Escalabilidad y coste. Los aptámeros terapéuticos se sintetizan químicamente y en consecuencia pueden escalarse fácilmente según sea necesario para satisfacer la demanda de producción. Mientras que las dificultades en el escalado de la producción limitan 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 solo sintetizador de oligonucleótidos a gran escala puede producir más de 100 kg/año y necesita una inversión inicial relativamente modesta. El coste actual de bienes para la síntesis de aptámeros a escala de kilogramo se estima en 500 \$/g, comparable con el de anticuerpos elevadamente optimizados. Se espera que las mejoras continuas en el desarrollo de procesos disminuyan el coste de los bienes a < 100 \$/g en cinco años.
  - 5) Estabilidad. Los aptámeros terapéuticos son químicamente robustos. Están adaptados intrínsecamente para recuperar la actividad después de la exposición a factores, tales como calor y agentes desnaturalizantes y pueden almacenarse durante periodos prolongados (> 1 año) a temperatura ambiente como polvos liofilizados. Por el contrario, los anticuerpos tienen que almacenarse refrigerados.
- Sistema de complemento. El sistema de complemento comprende un conjunto de al menos 20-30 proteínas de plasma y membrana que actúan juntas en un sistema de cascada regulado para atacar a formas extracelulares de patógenos (por ejemplo, bacterias). El sistema de complemento incluye tres cascadas de activación enzimática distintas, la clásica, lectina y vías alternativas (Figura 1) que convergen en la activación de C5 y dan como resultado una vía no enzimática conocida como la vía de ataque a membranas.
- La primera cascada activada enzimáticamente, conocida como la vía clásica, comprende varios componentes, C1, C4, C2, C3 y C5 (listados por su orden en la vía). La iniciación de la vía clásica del sistema de complemento sucede después de la unión y activación del primer componente de complemento (C1) por activadores tanto inmunes como no inmunes. C1 comprende un complejo de componentes dependientes de calcio C1q, C1r y C1s, y se activa mediante la unión del componente C1q. C1q contiene seis subunidades idénticas, y cada subunidad comprende tres cadenas (las cadenas A, B y C). Cada cadena tiene una región de cabeza globular que se conecta a una cola de tipo colágeno. La unión y activación de C1q mediante complejos de antígeno-anticuerpo sucede a través de la región del grupo de cabeza de C1q. Numerosos activadores de C1q que no son anticuerpos, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, se unen y activan a C1q a través de un sitio distinto en la región de la cola de tipo colágeno. El

reconocimiento molecular de los activadores de complemento por C1q induce un cambio conformacional que estimula la autoactivación de la proenzima C1r, que a su vez cataliza la activación proteolítica de C1s. Cs cataliza entonces la activación de los componentes C4 y C2 de complemento, formando el complejo C4bC2a que funciona como convertasa de C3.

5 La segunda cascada activada enzimáticamente, conocida como la vía de lectina, es similar a la primera, excepto en que el complejo MBL/MASP-2 ocupa el lugar de C1. La enzima de unión a manano (MBL) reconoce directamente a los polisacáridos que contienen manosa sobre las superficies de bacterias y es estructural y funcionalmente homóloga al componente C1q de C1. La unión de MBL al activador induce la activación de la proteasa 2 asociada a MBL (MASP-2). MASP-2, a su vez, cataliza la activación de C4 y C2 de manera homóloga a la función de C1s, lo que conduce a la formación de la convertasa C3.

15 La tercera cascada activada enzimáticamente, conocida como la vía alternativa, es una vía rápida, independiente de anticuerpos, para la activación y amplificación del sistema de complemento. La vía alternativa comprende varios componentes, C3, Factor B, y Factor D (listados en el orden de la vía). La activación de la vía alternativa sucede cuando C3b, una forma de escisión proteolítica de C3, se une a un agente de superficie activador, tal como una bacteria. El Factor B se une entonces a C3b, y se escinde mediante Factor D para producir la convertasa de C3, C3bBb. La amplificación de la actividad de convertasa de C3 sucede a medida que se produce y deposita C3b. La respuesta de amplificación está ayudada además por la unión del regulador positivo de proteínas properdina (p), que estabiliza a la convertasa activa frente a la degradación, aumentando su semivida de 1-2 minutos a 18 minutos.

20 Por lo tanto, las tres vías producen convertasas C3 que separan al factor C3 en C3a y C3b. En este momento, ambas convertasas C3 (clásica/lectina y alternativa) se ensamblan adicionalmente en convertasas C5 (C4b2a3b y C3b3bBb). Estos complejos a continuación escinden el componente de 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 7 proteínas G transmembrana, que se asociaba originalmente con leucocitos y ahora se sabe que se expresa en varios tejidos, incluyendo hepatocitos y neuronas. La molécula C5a es el componente quimiotáctico principal del sistema de complemento humano y puede activar varias respuestas biológicas incluyendo la quimiotaxis de leucocitos, la contracción de músculos lisos, la activación de vías de transducción de señales intracelulares, la adhesión endotelial de neutrófilos, la liberación de citocinas y mediadores lipídicos y la formación de oxidantes.

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

40 Aunque el sistema de complemento tiene un papel importante para el mantenimiento de la salud, tiene el potencial de causar o contribuir a la enfermedad. Por ejemplo, se ha implicado al sistema de complemento con los efectos secundarios relacionados con el injerto de revascularización quirúrgica arterial coronaria ("CABG"), numerosas enfermedades y/o afecciones renales, reumatológicas, neurológicas, dermatológicas, hematológicas, vasculares/pulmonares, alérgicas, infecciosas y de biocompatibilidad/choque. El sistema de complemento no es necesariamente la única causa del estado de enfermedad, pero puede ser uno de los varios factores que contribuyen a la patogénesis.

45 Recientemente, los datos sugieren que el complemento también está implicado en la enfermedad ocular. Por consiguiente, podría ser beneficioso tener inhibidores novedosos del sistema de complemento para su uso como agentes terapéuticos y diagnósticos en el tratamiento de trastornos oculares relacionados con el complemento.

50 Avery et al (Ophthalmology 2006; 113:363-372) comunicaron la seguridad a corto plazo, el efecto biológico y el posible mecanismo de acción de bevacizumab intravítreo en pacientes con degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) neovascular.

55 Heier (Ophthalmology 2006; 113:633642) evaluó la seguridad de inyecciones intravítreas repetidas de ranibuzumab en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) neovascular, y evaluó cambios en la actividad visual (AV) y en las características de la lesión de la DMAE.

60 Nozaki et al. (Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularisation, PNAS (2006) 103(7): 2328-2333) describen pruebas de que fragmentos bioactivos de los componentes de complemento C3a y C5a están presentes en drusas de pacientes con DMAE, y que C3a y C5a inducen la expresión de VEGF *in vitro* e *in vivo*.

65 Bora et al. (Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularisation, The Journal of Immunology (2005) 174:491-497) describen la deposición de C3 y del complejo de ataque a membranas en el complejo neovascular en un modelo murino de CNV inducido por láser. Comunican

que un anticuerpo anti-C6 murino inhibió la formación de MAC y dio como resultado la inhibición de CNV.

El documento WO 2005/079363 describe el aptámero anti-C5 ARC1905.

**Breve descripción de los dibujos**

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

5 La Figura 2 es una representación esquemática del proceso de selección de aptámeros *in vitro* (SELEX™) a partir de grupos de oligonucleótidos de secuencia al azar.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

45 La Figura 10 es otra gráfica que ilustra la unión de ARC186 (SEC ID N°: 4) a proteína C5 purificada tanto a 37 °C como a temperatura ambiente (23 °C) después de una incubación de 4 horas.

50 La Figura 11 es una gráfica que muestra el trascurso de tiempo de disociación de un complejo C5•ARC186 a 23 °C.

La Figura 12 es una gráfica que muestra el trascurso de tiempo de equilibrado en la formación de un complejo C5•ARC186 a 23 °C.

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

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

La Figura 15 es una gráfica que ilustra la cantidad de proteína de complemento C5b producida en muestras de sangre incubadas durante 5 horas a 25 °C y 37 °C en presencia de concentraciones variantes del aptámero ARC186 (SEC ID N°: 4).

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

- La Figura 17 es una gráfica que muestra que ARC658 (SEC ID N°: 62) inhibe por completo la activación de complemento (C5a) en el modelo de bucle de tubo descrito en el Ejemplo 1D.
- 5 La Figura 18 es una gráfica que ilustra las constantes de disociación para el ciclo 10 de los grupos de selección de C5. Las constantes de disociación ( $K_d$ ) se estimaron ajustando los datos a la ecuación: fracción de ARN unido =  $\text{amplitud} \cdot K_d / (K_d + [C5])$ . "ARC520" (SEC ID N°: 70) se refiere al grupo de dRmY no seleccionado sin exposición previa y el "+" indica la presencia de competidor (ARNt 0,1 mg/ml, ADN de esperma de salmón 0,1 mg/ml).
- 10 La Figura 19 es una gráfica que representa las curvas de constante de disociación de clon de C5. Las constantes de disociación ( $K_d$ ) se estimaron ajustando los datos a la ecuación: fracción de ARN unido =  $\text{amplitud} \cdot K_d / (K_d + [C5])$ .
- 15 La Figura 20 es una gráfica que representa una curva de  $CI_{50}$  que ilustra el efecto inhibitorio sobre la actividad de hemólisis de concentraciones variables del clon de aptámero anti-C5 ARC913 (SEC ID N°: 75) en comparación con ARC186 (SEC ID N°: 4).
- La Figura 21 es una ilustración que representa la estructura de ARC187 (SEC ID N°: 5).
- 20 La Figura 22 es una ilustración que representa la estructura de ARC1905 (SEC ID N°: 67).
- La Figura 23 es una tabla que indica el diseño experimental del primer estudio de corazón en perfusión aislado.
- 25 La Figura 24 es una gráfica que compara las representaciones de la presión para la presión intraventricular en el ventrículo izquierdo (VI) de un corazón aislado expuesto a plasma humano (A) con las representaciones de la PVI de un corazón aislado expuesto a la solución de aptámero de control (B).
- 30 La Figura 25 es una gráfica que compara las representaciones de la presión para la presión intraventricular en el ventrículo izquierdo (VI) de los corazones aislados expuestos al equivalente molar, 10x y 50x aptámero/soluciones de C5 (donde se asume una concentración de aproximadamente 500 nM para C5 en plasma humano normal sin diluir).
- 35 La Figura 26 es una gráfica que compara los cambios en la frecuencia cardíaca por minuto (ppm) en corazones de ratón aislados después de la exposición a plasma humano y a varias soluciones de plasma/aptámero.
- 40 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 a plasma humano que contenía una relación molar de 0 - 1 X de ARC186 (SEC ID N°: 4) (corazones fallidos), o una relación molar de 10 - 50 X (corazones protegidos por aptámero de C5).
- 45 La Figura 28 es una gráfica que compara la producción relativa de C5a en plasma humano, que contiene concentraciones variables de aptámero, después de perfusión a través de corazones de ratón aislados. Las concentraciones relativas de C5a se representan en unidades de absorbancia (Abs), donde las lecturas mayores reflejan la presencia de niveles mayores de C5a.
- 50 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 perfusión a través de corazones de ratón aislados.
- La Figura 30 es una gráfica que muestra el efecto de ARC186 (SEC ID N°: 4) sobre la escisión de C3 en efuente de corazón de ratón.
- 55 La Figura 31 es una tabla que muestra los resultados de la tinción de inmunohistoquímica para el estudio de corazón de ratón en perfusión aislados.
- La Figura 32 es una tabla que muestra la proporción de ARC658 (SEC ID N°: 62) necesaria, en suero humano o de primate, para proteger al corazón del daño mediado por C5b.
- 60 La Figura 33 es una gráfica que muestra una representación logarítmica-lineal del porcentaje restante de ARC186 de longitud completa en función del tiempo de incubación en plasma tanto de rata como de macaco cinomolgo.
- 65 La Figura 34 es una tabla que muestra el diseño experimental del estudio farmacocinético llevado a cabo con 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 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62) o ARC187 (SEC ID N°: 5) frente al tiempo en ratas Sprague-Dawley.

La Figura 36 es una gráfica que ilustra la concentración media en plasma de ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 63) y ARC187 (SEC ID N°: 5) a lo largo del tiempo después de administración intravenosa de aptámero en ratas.

5 La Figura 37 es una tabla que muestra el análisis no compartimental de los datos de la concentración frente al tiempo ilustrados en las Figuras 35 y 36.

10 La Figura 38A es una tabla que muestra el diseño para el estudio farmacocinético de ARC187 (SEC ID N°: 5) y ARC1905 (SEC ID N°: 67) en ratones; La Figura 38B es una gráfica que representa el perfil farmacocinético de ARC187 (SEC ID N°: 5) y ARC1905 (SEC ID N°: 67) en ratones CD-1 después de una sola administración de bolo IV; La Figura 38C es una tabla que muestra el análisis no compartimental de los datos de la concentración frente al tiempo ilustrados en la Figura 38B.

15 La Figura 39 es una tabla que muestra la detección de los aptámeros listados en tejido cardiaco de ratón después de administración intravenosa.

La Figura 40 es una tabla que muestra el diseño experimental del estudio animal 1, descrito en el Ejemplo 5E.

20 La Figura 41 es una tabla que muestra la concentración en plasma de aptámero frente al tiempo después de administración intravenosa de bolo de aptámero a macacos cinomolgo.

25 La Figura 42 es una tabla que lista los parámetros farmacocinéticos para ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 63) y ARC187 (SEC ID N°: 5) administrados por vía intravenosa a macacos cinomolgo en el estudio 1.

30 Las Figuras 43(a) y 43(c) son gráficas que ilustran las concentraciones de sC5b-9 y C5a frente al tiempo después de administración intravenosa de los aptámeros anti-C5 ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62), o ARC187 (SEC ID N°: 5) a macacos cinomolgo; Las Figuras 43(b) y 43(d) son gráficas que ilustran las concentraciones en plasma de sC5b-9 y C5 frente a la concentración de los aptámeros anti-C5 ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62), o ARC187 (SEC ID N°: 5).

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

35 La Figura 45 es una gráfica que muestra la concentración media de aptámero en plasma en varios instantes después de la administración intravenosa de ARC658 (SEC ID N°: 62), o ARC187 (SEC ID N°: 5) a macacos cinomolgo.

40 La Figura 46 es una tabla que muestra los dos análisis compartimentales de la concentración frente al tiempo después de administración de aptámero mediante bolo intravenoso a macacos cinomolgo.

La Figura 47 es una gráfica que ilustra la concentración de C5b-9 frente a la concentración de ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC658 (SEC ID N°: 62) en presencia de zimosano en plasma de cinomolgo.

45 La Figura 48 es una gráfica que ilustra la concentración de C5a frente a la concentración de ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC658 (SEC ID N°: 62) en presencia de zimosano en plasma de cinomolgo.

La Figura 49 es una tabla que resume el estudio de FC-FD de ARC187 (SEC ID N°: 5) durante y después de bolo IV más administración por infusión a macacos cinomolgo.

50 La Figura 50 es una tabla que resume los parámetros farmacocinéticos para ARC187 (SEC ID N°: 5) en macacos cinomolgo después de administración de bolo IV.

55 La Figura 51 es una gráfica que ilustra los perfiles farmacocinéticos calculados y medidos reales de ARC187 (SEC ID N°: 5) durante y después de bolo IV más administración por infusión a macacos cinomolgo.

La Figura 52 es una gráfica que muestra que los niveles en plasma de ARC187 activo (SEC ID N°: 5) permanecen constantes durante y después de bolo IV más administración por infusión a macacos cinomolgo.

60 La Figura 53 es una tabla que muestra las necesidades de dosificación predichas en humanos para aptámeros anti-C5 en cirugía CABG.

65 La Figura 54 es una gráfica que ilustra que ARC187 (SEC ID N°: 5) no tiene relativamente efecto sobre la coagulación según se mide por el tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT).

La Figura 55 es una tabla que resume los efectos *in vitro* de ARC187 (SEC ID N°: 5) sobre la actividad



anticoagulante de heparina, y la actividad procoagulante de protamina.

La Figura 56 es una gráfica que muestra que ARC187 (SEC ID N°: 5) no efectúa la reversión de la anticoagulación de la heparina *in vivo*.

La Figura 57 es una gráfica que muestra que la heparina y la protamina no tienen efecto sobre la función anticomplemento de ARC187 (SEC ID N°: 5), medido por la inhibición de la activación de complemento de zimosano.

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

La Figura 59A es una gráfica que ilustra la inhibición porcentual de hemólisis en presencia de suero humano, de mono cinomolgo y de rata por ARC1905 (SEC ID N°: 67); La Figura 59B es una tabla que resume los valores medios de  $Cl_{50}$  para la inhibición de la activación de complemento en suero humano, de mono cinomolgo y de rata por ARC1905, un aptámero anti-C5 o ARC 127, un aptámero irrelevante que no se une a C5 (control negativo).

La Figura 60 es una gráfica que ilustra el valor de  $Cl_{50}$  para la inhibición de ARC186 radiomarcado (SEC ID N°: 4) (eje vertical) en función de la concentración del competidor no marcado ARC1905 (SEC ID N°: 67) o ARC672 (SEC ID N°: 63) (eje horizontal), en un ensayo de competición de unión.

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

La Figura 62 es una gráfica que ilustra curvas patrón para C5a humano (hC5a) y C5a de mono cinomolgo (hC5a eq.).

La Figura 63 es una tabla que resume los valores de  $Cl_{50}$ ,  $Cl_{90}$  y  $Cl_{99}$  para la inhibición de la activación de C5 en suero humano y de mono cinomolgo por ARC1905 (SEC ID N°: 67), medido en el ensayo de activación de complemento inducida por zimosano.

La Figura 64 es una gráfica que ilustra la inhibición porcentual de generación de C5a en función de la concentración de ARC1905 (SEC ID N°: 67) en sueros de humano y de mono cinomolgo medido en un ensayo de activación de complemento inducido por zimosano.

La Figura 65 es una gráfica que ilustra el efecto de ARC1905 (SEC ID N°: 67) en la generación de C3a en suero de humano o de mono cinomolgo, medido en el ensayo de activación de complemento inducida por zimosano.

La Figura 66 es una tabla que resume los valores medios de  $Cl_{50}$ ,  $Cl_{90}$  y  $Cl_{99}$  para la inhibición de la activación del complemento por ARC1905 (SEC ID N°: 67) en suero humano de 5 donantes, medido en un modelo de activación de complemento de bucle de tubo.

La Figura 67 es una gráfica que ilustra la inhibición porcentual de la generación de C5a y C3a en función de la concentración de ARC1905, un aptámero anti-C5, o ARC 127, un aptámero irrelevante que no se une a C5 (control negativo) en un modelo de activación de complemento de bucle de tubo.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) de tipo no exudativo de acuerdo con la reivindicación 1.

En realizaciones de la invención, el aptámero anti-complemento modula una función de un componente de complemento o una variante del mismo. En realizaciones particularmente preferidas, un aptámero anti-complemento inhibe o disminuye una función del componente de complemento o una variante del mismo, preferentemente *in vivo*, preferentemente en un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente, en seres humanos *in vivo*. En algunas realizaciones de la invención, donde C5 es la diana de complemento, la función modulada, preferentemente inhibida, por el aptámero es la escisión de la proteína de complemento. En algunas realizaciones de la invención, por ejemplo en los casos donde C2b, C5b, C6, C7, C8, C9, Factor B y/o properdina es la diana de complemento, la función modulada, preferentemente inhibida, por el aptámero es el ensamblaje del agregado de componente de complemento activo, tal como una convertasa o el complejo de ataque a membranas.

En una realización, el método para estabilizar, tratar y/o prevenir comprende la etapa de administrar el aptámero anti-C5 a un sujeto que lo necesite en una cantidad suficiente para estabilizar, tratar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo.

5 En algunas realizaciones, el método para estabilizar, tratar y/o prevenir comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del aptámero anti-complemento a un sujeto que lo necesite. La cantidad terapéuticamente eficaz del aptámero anti-complemento es una cantidad suficiente para estabilizar, tratar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo.

10 En algunas realizaciones, se proporciona un método para estabilizar la DMAE de tipo no exudativo, que comprende administrar el aptámero anti-complemento a un sujeto que lo necesite en una cantidad suficiente para estabilizar la DMAE de tipo no exudativo. En algunas realizaciones, el aptámero anti-complemento se administra en una cantidad suficiente para mantener al menos el mismo nivel de agudeza visual del sujeto en comparación con el nivel de agudeza visual del sujeto tres la administración del aptámero anti-complemento. En algunas realizaciones, el aptámero anti-complemento se administra en una cantidad suficiente para mantener aproximadamente el mismo nivel de densidad vascular de la retina del sujeto como aquella del sujeto tras la administración del aptámero. En algunas realizaciones, el aptámero anti-complemento se administra en una cantidad suficiente para estabilizar o mantener el nivel de neovascularización asociado al sangrado, acumulación de fluidos, desprendimiento de retina y/o cicatrización en el sujeto en relación al nivel del sujeto de sangrado asociado a neovascularización, acumulación de fluidos, desprendimiento de retina y/o cicatrización tras la administración del aptámero anti-complemento.

20 En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar DMAE de tipo no exudativo que comprende administrar el aptámero anti-complemento a un sujeto que lo necesite en una cantidad suficiente para reducir un síntoma de la DMAE de tipo no exudativo. En algunas realizaciones, el aptámero anti-complemento se administra en una cantidad suficiente para mejorar el nivel de agudeza visual en el sujeto en relación al nivel agudeza visual del sujeto tras la administración del aptámero anti-complemento. En algunas realizaciones, el aptámero anti-complemento se administra en una cantidad suficiente para reducir el nivel de densidad de vasos retinales en el sujeto en relación al nivel de densidad de vasos retinales tras la administración del aptámero anti-complemento. En algunas realizaciones, el aptámero anti-complemento se administra en una cantidad suficiente para reducir el nivel de sangrado asociado a la neovascularización, acumulación de fluidos, desprendimiento de retina y/o cicatrización en el sujeto en relación al nivel del sujeto de sangrado asociado a neovascularización, acumulación de fluidos, desprendimiento de retina y/o cicatrización tras la administración del aptámero anti-complemento.

30 En algunas realizaciones, se proporciona un método para prevenir la DMAE de tipo no exudativo en un sujeto, comprendiendo el método la etapa de administrar el aptámero anti-complemento al sujeto en una cantidad suficiente para prevenir un síntoma clínico de la DMAE de tipo no exudativo. En algunas realizaciones, el aptámero anti-complemento se administra en una cantidad suficiente para prevenir la pérdida clínica de agudeza visual en el sujeto. En algunas realizaciones, el aptámero anti-complemento se administra en una cantidad suficiente para prevenir un nivel de densidad de vasos retinales en el sujeto correlativos con la enfermedad neovascular ocular clínica. En algunas realizaciones, el sujeto está en riesgo de desarrollar DMAE de tipo no exudativo. En algunas realizaciones, el método comprende además identificar a un sujeto en riesgo de desarrollar DMAE de tipo no exudativo antes de la administración del aptámero anti-complemento. En algunas realizaciones, la etapa de identificación comprende detectar la presencia de drusas y/o cambios en la pigmentación retinal en el sujeto y no detectar pérdida clínica de agudeza visual. En algunas realizaciones, la etapa de identificación comprende detectar una variación en el factor H de complemento del sujeto en relación al factor H de tipo silvestre. La secuencia de aminoácidos de factor H de tipo silvestre se comunica en Ripoche et al (1988) The complete amino acid sequence of human complement factor H. Biochem. J. 249, 593-602. En algunas realizaciones, la vía de administración del aptámero anti-complemento es administración ocular o periocular.

50 En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el método comprende adicionalmente la etapa de administrar al sujeto un agente anti-VEGF, en particular, un agente anti-VEGF seleccionado del grupo que consiste en: una molécula de ácido nucleico, un aptámero, una molécula antisentido, una molécula de ARNi, una proteína, un péptido, un péptido cíclico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un azúcar, un polímero, y una molécula pequeña.

55 En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el método comprende adicionalmente la etapa de administrar al sujeto un agente anti-PDGF, en particular, un agente anti-PDGF seleccionado del grupo que consiste en: una molécula de ácido nucleico, un aptámero, una molécula antisentido, una molécula de ARNi, una proteína, un péptido, un péptido cíclico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un azúcar, un polímero, y una molécula pequeña.

60 En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el método comprende adicionalmente administrar un agente anti-vascular al sujeto. En algunas realizaciones, el agente anti-vascular es un derivado de porfirina. En algunas realizaciones el derivado de porfirina es verteporfina para inyección (Visudyne®, Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ). En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de activar el derivado de porfirina con luz láser.

65 En realizaciones de la invención, el aptámero anti-C5 es las SEC ID N°: 4, 5 o 67. En una realización preferida, el aptámero específico de C6 para su uso en los métodos descritos anteriormente se selecciona del grupo que consiste

en ARC187 (SEC ID N°: 5) y ARC1905 (SEC ID N°: 67).

En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el aptámero anti-C5 se administra por administración ocular, en particular mediante administración intravítrea. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el agente anti-VEGF, el agente anti-PDGF y/o el agente antivascular se administra mediante administración ocular. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el agente anti-C5, el agente anti-VEGF, el agente anti-PDGF y/o el agente antivascular administrado es un profármaco. En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el sujeto es un ser humano.

El aptámero anti-complemento inhibe una diana de complemento seleccionada entre C5. En algunas realizaciones, el aptámero anti-complemento no es un aptámero con afinidad y elevada especificidad para una diana de complemento seleccionada de: C3a, receptor de C3a, C5a, y receptor de C5a. En algunas realizaciones, el aptámero anti-complemento no es un aptámero con afinidad y elevada especificidad para una diana de complemento seleccionada del grupo que consiste en: factor B y factor D.

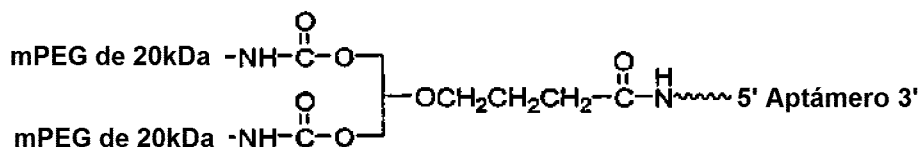
En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, el aptámero anti-complemento se administra a un sujeto mediante administración ocular, particularmente, mediante administración intravítrea o peri-ocular. En algunas realizaciones, el aptámero anti-complemento a administrar a un sujeto está comprendido en una formulación de depósito.

La expresión "tras la administración de aptámero anti-complemento" tal como se usa en el presente documento abarca el tiempo en el que el síntoma en cuestión se midió o determinó clínicamente donde la medida o determinación fue a un tiempo en el intervalo en el intervalo desde antes de la administración de aptámero anti-complemento hasta e incluyendo la medida justo después de la administración de aptámero, por ejemplo, hasta 12 horas después, 24 horas después, o 48 horas después de la administración.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica ocular que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un aptámero anti-complemento, por ejemplo, una cantidad suficiente para estabilizar, tratar y/o prevenir un trastorno ocular mediado por complemento. La composición farmacéutica de la invención puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En este aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que inhibe una función diana de complemento ocular *in vivo*, particularmente en un sujeto humano, o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica ocular comprende una formulación en depósito.

En una realización, el aptámero anti-complemento para su uso en los métodos anteriores es un aptámero que inhibe a C5 *in vivo*, preferentemente a C5 humano. En una realización particular, se proporciona un aptámero anti-C5 de acuerdo con ARC186 (SEC ID N°: 4) o un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con ARC186 (SEC ID N°: 4) conjugado a un resto de PEG para su uso en los métodos anteriores. En realizaciones particulares, este conjugado de aptámero ARC186 /PEG comprende sustancialmente la misma afinidad de unión por la proteína de complemento C5 que un aptámero que consiste en la secuencia de acuerdo con SEC ID N°: 4 pero que carece del resto de PEG. Sustancialmente la misma afinidad de unión, tal como se usa en el presente documento, significa una diferencia de no más de aproximadamente 2 a 10 veces, preferentemente una diferencia de no más de 2 a diez veces en las constantes de disociación medidas mediante análisis de transferencia por puntos. En algunas realizaciones, las constantes de disociación se miden mediante un análisis de transferencia por puntos competitivo, tal como se describe en el Ejemplo 1A más adelante. En algunas realizaciones, el resto de polietilenglicol comprende un peso molecular mayor de 10 kDa, en particular, un peso molecular de 20 kDa, más particularmente de 30 kDa y más particularmente de 40 kDa. En algunas realizaciones, el resto de PEG está conjugado al extremo 5' de ARC186 (SEC ID N°: 4). En algunas realizaciones, el conjugado de aptámero/PEG comprende una semivida, preferentemente la semivida terminal en un modelo de dos compartimentos determinada según el método descrito en el Ejemplo 5E más adelante, de al menos 15 horas, preferentemente de al menos 24 horas, más preferentemente de 48 horas en primates. En algunas realizaciones, el conjugado de aptámero/PEG comprende una semivida, preferentemente la semivida terminal en un modelo de dos compartimentos, de al menos 10, preferentemente de al menos 15 horas en ratas. En algunas realizaciones, el PEG conjugado al extremo 5' de ARC186 (SEC ID N°: 186) es un PEG de 40 kDa. En realizaciones particulares, el PEG de 40 kDa es un PEG ramificado. En algunas realizaciones, el PEG ramificado de 40 kDa es 1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida). En otras realizaciones, el PEG de 40 kDa es 2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo.

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



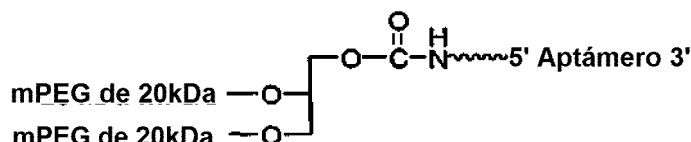
donde,

"" indica un enlazador

**Aptámero** = fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG - 3T (SEC ID N°: 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 y 3T indica una desoxitimidina invertida.

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



donde,

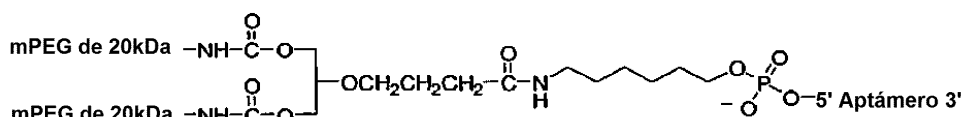
"" indica un enlazador

**Aptamer** = fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG - 3T (SEC ID N°: 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 y 3T indica una desoxitimidina invertida.

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el enlazador es un enlazador de alquilo. En realizaciones particulares, el enlazador de alquilo comprende de 2 a 18 grupos CH<sub>2</sub> consecutivos. En realizaciones preferidas, el enlazador de alquilo comprende de 2 a 12 grupos CH<sub>2</sub> consecutivos. En realizaciones particularmente preferidas, el enlazador de alquilo comprende de 3 a 6 grupos CH<sub>2</sub> consecutivos.

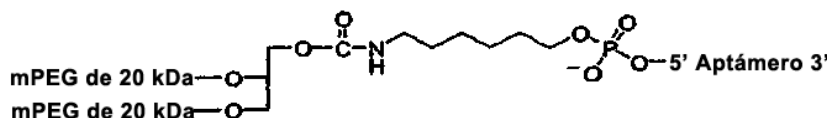
En una realización particular, se proporciona un aptámero, ARC187 (SEC ID N°: 5), que tiene la estructura que se expone a continuación:



donde **Aptámero** = fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T (SEC ID N°: 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 y donde 3T indica una desoxitimidina invertida.

En otra realización, se proporciona un aptámero, ARC1905 (SEC ID N°: 67), que tiene la estructura que se expone a continuación:



donde **Aptámero** = fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T (SEC ID N°: 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 y donde 3T indica una desoxitimidina invertida.

En una realización, se proporciona una composición farmacéutica ocular que comprende una cantidad de ARC186 (SEC ID N°: 4), ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC1905 (SEC ID N°: 67) o una sal de los mismos efectiva para tratar, estabilizar y/o prevenir DMAE de tipo no exudativo en un sujeto. La composición farmacéutica de la invención puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En este aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que inhibe la

escisión de la proteína de complemento C5 *in vivo* o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En este aspecto, se proporciona una composición farmacéutica de ARC186 (SEC ID N°: 4), ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC1905 (SEC ID N°: 67) para su uso en el tratamiento, estabilización y/o prevención de DMAE de tipo no exudativo *in vivo*. Asimismo, en este aspecto de la invención, se proporciona ARC186 (SEC ID N°: 4), ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC1905 (SEC ID N°: 67) para el uso en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento, estabilización y/o prevención de DMAE de tipo no exudativo en un sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas. En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC1905 (SEC ID N°: 67) o una sal de los mismos. La composición farmacéutica de la invención puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En este aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5 *in vivo* o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En este aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica de ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC1905 (SEC ID N°: 67) para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad *in vivo*. Asimismo, en este aspecto de la invención, se proporcionan ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC1905 (SEC ID N°: 67) para su uso en la preparación de una composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, el método de la invención incluye administrar la composición farmacéutica que comprende ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC1905 (SEC ID N°: 67) para lograr una concentración en plasma de aptámero que sea de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 veces aquella de proteína de complemento C5 endógena. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de aptámero ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC1905 (SEC ID N°: 67) se administran para lograr una concentración en plasma de aptámero que es de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 3 veces, y de 1,5 a aproximadamente 2 veces la de proteína de complemento C5 endógena mientras que en otras realizaciones la composición de aptámero se administra para lograr una concentración equivalente a aquella de la proteína de complemento endógena. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención que comprende ARC187 (SEC ID N°: 5) o ARC1905 (SEC ID N°: 67) se administra para lograr una concentración de aptámero en plasma de aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 4  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 3  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 2  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 1,5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  de aproximadamente 500 nM.

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

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

La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que bloquea la escisión de proteína de complemento C5 *in vivo* o una sal de la misma y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, el método de la invención incluye administrar la composición farmacéutica que comprende un aptámero de acuerdo con la reivindicación 1 a un paciente para lograr una concentración en plasma de aptámero que es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 veces la de la proteína de complemento C5 endógena. En algunas realizaciones, se administran composiciones farmacéuticas de aptámero para lograr una concentración en plasma de aptámero que es de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 5 veces, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 3 veces y de 1,5 a aproximadamente 2 veces la de la proteína de complemento C5 endógena, mientras que en otras realizaciones, se administra la composición de aptámero para lograr una concentración equivalente a la de la proteína de complemento endógena. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran para lograr una concentración en plasma de aptámero de aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 4  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 3  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 2  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 1,5  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  o de aproximadamente 500 nM.

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

#### Descripción detallada de la invención

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta a continuación.

Aunque se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para llevar a la práctica o en el ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción. En la memoria descriptiva, las formas de singular también incluyen el plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la materia a la cual pertenece esta invención. En caso de conflicto, gobernará la presente memoria descriptiva.

#### Agentes anti-C5 y trastornos oculares

Datos recientes sugieren que la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es también una enfermedad mediada por la inflamación en la que la activación de complemento juega un papel. La degeneración macular asociada a la edad ("DMAE") es una enfermedad ocular crónica y progresiva y es la causa principal de pérdida de la visión irreparable en los Estados Unidos, Europa, y Japón. La DMAE está caracterizada por el deterioro progresivo de la porción central de la retina citada como la mácula. El indicador más claro de la progresión a DMAE es la aparición de drusas, depósitos blancos-amarillos bajo la retina, que son placas de material que se derivan de los productos de desecho metabólicos de células retinianas. La aparición de una drusa es un componente importante de las dos formas de DMAE: exudativa ("húmeda") y no exudativa ("seca"). La DMAE húmeda sucede cuando nuevos vasos sanguíneos que crecen justo por debajo de la retina invaden las capas retinales a través de una membrana conocida como membrana de Bruch. Este crecimiento anormal de crecimiento de vasos sanguíneos se cita generalmente como angiogénesis o neovascularización (coroidal). Estos nuevos vasos tienden a ser frágiles y a menudo sangran y filtran fluido a la mácula, que a menudo da como resultado una disrupción a menudo severa de la visión. Aunque tratamientos nuevos (por ejemplo, Lucentis™) pueden detener la angiogénesis y revertir la acumulación de fluido, e incluso restaurar la visión en una minoría de pacientes, la lesión neovascular a menudo conduce a una cicatrización y/o daño a las células retinales causando una pérdida permanente de la visión. La DMAE húmeda está generalmente precedida por el desarrollo de drusas que se acumulan y que contienen proteínas de complemento, incluyendo factor H de complemento (CHF). La presencia de numerosas drusas de intermedias a grandes se asocia con el mayor riesgo de progresión a enfermedad en estado tardío, caracterizado por atrofia geográfica y/o neovascularización. La mayoría de pacientes con DMAE húmeda experimentan pérdida grave de la visión en el ojo afectado entre meses a años después del diagnóstico de la enfermedad, aunque la pérdida de la visión puede suceder en horas o días. La DMAE seca es más gradual y sucede cuando las células sensibles a la luz en la mácula se atrofian lentamente, de manera gradual enturbiando la visión central en el ojo afectado. La pérdida de visión se exagera por la formación y acumulación de drusas y a veces el deterioro de la retina, aunque sin crecimiento anormal de vasos sanguíneos y sangrado.

Hay componentes de complemento y otros mediadores de la inflamación en drusas y células inflamatorias que se observan en las lesiones que causan la pérdida de visión relacionada con la DMAE (Haines et al., (2005) Science 308: 419-421). La DMAE está fuertemente relacionada con un defecto genético en la vía de regulación de complemento (Haines et al., 2005). Una variante en un gen que codifica el factor H de complemento (CFH) parece contribuir al riesgo aumentado de DMAE en gran medida o por completo mediante su impacto en el desarrollo de drusas, un precursor de la neovascularización y pérdida de visión asociada con DMAE (Edwards et al., (2005) Science 308:421-424). La función principal de CHF es regular negativamente la actividad de la cascada alternativa de convertasas uniéndose a e inactivando C3b o estimulando la disociación de factor Bb desde C3b. (Hageman et al. (2005) PNAS 102(2):7227-7232). Los datos genéticos recientes sugieren que una persona con drusas de tipo DMAE húmedo tiene una posibilidad del 50 % - 70 % de portar el alelo de CFH que da como resultado una correlación extremadamente predictiva y fuerte entre la intervención de complemento y el tratamiento de DMAE (Klein et al., (2005) Science 308: 385-389). Un aptámero anti-C5 que bloquea su activación, lo hará incluso si el paciente porta el gen de CFH defectuoso asociado con la DMAE. Del mismo modo, los aptámeros que inhiben la actividad de dianas de cascada alternativas, tales como factor B, factor D, y properdina, componentes comunes de cascada, en particular C3, y componentes del complejo de ataque a membranas, inhibirán la actividad incluso si el paciente porta el gen de CFH defectuoso asociado con la DMAE. Se ha determinado que varios haplotipos del gen de factor H (CFH) de complemento están asociados con el riesgo de una persona para desarrollar degeneración macular (DMAE). En particular, un cambio de tirosina-histidina en el aminoácido 402 en el factor H de complemento (CFH) en el cromosoma 1 da como resultado la formación de una variante genética de CFH que está fuertemente asociada con la susceptibilidad a la enfermedad. El cambio de secuencia está en una región de CFH que se une a heparina y a proteína C reactiva. La gente cuya configuración genética incluye esta variante del gen de CFH tiene mayores posibilidades de desarrollar DMAE. La variante del gen de CFH puede ser responsable de aproximadamente la mitad de los 15 millones de casos de degeneración macular en los Estados Unidos. Las posibilidades de desarrollar degeneración macular están aumentadas en aproximadamente 2,5 a 5,5 veces si se tiene la variante genética de CFH.

El gen de CFH está involucrado en la regulación de las vías inflamatorias (vía de complemento alternativa). Esto implica que la inflamación también juega un papel importante en el desarrollo de la degeneración macular. Los niveles en sangre de un marcador inflamatorio de proteína C reactiva (CRP) se han encontrado también elevados en la degeneración macular. (Science. 15 de Abril de 2005;308(5720):419-21, Science. 15 de Abril de 2005;308(5720):421-4, Science. 15 de Abril de 2005;308(5720):385-9). Basándose en su localización en la región de

unión a heparina y CRP del factor H, la variante Y402H puede interrumpir el reclutamiento mediado por proteoglicano y CRP de factor H a la superficie de células hospedadoras, lo que evita la capacidad del factor H para regular negativamente el C3b depositado en estas células. De manera descontrolada, la amplificación de la vía de complemento en el tejido hospedador causa inflamación en la retina y en los vasos sanguíneos circundantes debido a la liberación no controlada de C5a y C5b-9. CFH evita la activación incontrolada del complemento y la inflamación; por lo tanto, una mutación en CFH aumentará la inflamación y sus consecuencias. Reduciendo la activación excesiva del complemento (vía inflamatoria) que sucede en la degeneración macular, se puede ser capaz de frenar el progreso de la enfermedad. Adicionalmente, detectar la variante del gen puede algún día usarse en combinación con tecnologías de formación de imágenes para identificar individuos con elevado riesgo de desarrollar DMAE avanzada de lo que es actualmente posible. (JAMA. 20 de Abril de 2005;293(15):18410)

Los tejidos y fluidos oculares normalmente contienen muchos componentes de complemento, tales como Factor B y C2, C4, C3, C5, C6, y C7 en el tejido uveal (Brawman-Mintzer O, Invest Ophthalmol Vis Sci. Oct 1989;30(10):2240). C1, C4, C3 y C5 en el humor acuoso (Mondino BJ, Arch Ophthalmol. Mar 1983;101(3):465-8), y C1, C4, C2, C3, C5, C6 y C7 en la córnea (Mondino BJ, Arch Ophthalmol. 1981 Ago ;99(8):1430-3). Estos componentes de complemento y proteínas reguladoras de complemento asociadas se consideran importantes para la vigilancia inmunitaria normal en los tejidos oculares.

Por consiguiente, la presente invención proporciona aptámeros anti-C5 para el tratamiento de DMAE de tipo no exudativo. En algunas realizaciones, se usa un aptámero anti-C5 de la invención solo, mientras que en otras realizaciones se usa en combinación con un agente anti-VEGF y/o anti-PDGF.

Las realizaciones de la invención proporcionan aptámeros anti-complemento para el tratamiento, estabilización y/o prevención de la DMAE de tipo no exudativo. Los aptámeros anti-complemento pueden generarse mediante el método SELEX™. En realizaciones particulares, la invención comprende administrar un aptámero anti-C5 a un sujeto en un método para reducir, estabilizar y/o prevenir al menos un síntoma de DMAE no exudativa.

#### Aptámeros específicos de C5

Los aptámeros específicos de C5 para su uso en el tratamiento, estabilización, prevención y/o reducción de los síntomas de trastornos oculares mediados por complemento pueden generarse mediante el método SELEX™. En realizaciones particulares, la invención comprende administrar un agente de aptámero anti-C5 a un sujeto en un método para reducir, estabilizar y/o prevenir al menos un síntoma de una DMAE no exudativa.

Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que tienen afinidad de unión específica para moléculas mediante interacciones diferentes del emparejamiento de bases clásico de Watson-Crick.

Los aptámeros, al igual que los péptidos generados mediante presentación de fagos o los anticuerpos monoclonales ("Acm"), son capaces de unirse específicamente a dianas seleccionadas y de modular la actividad de la diana, por ejemplo, mediante la unión de aptámeros puede bloquearse la capacidad de funcionar de su diana. Creados mediante un proceso de selección *in vitro* a partir de grupos de oligonucleótidos de secuencia al azar, se ha generado aptámeros para más de 100 proteínas, incluyendo factores de crecimiento, factores de transcripción, enzimas, inmunoglobulinas, y receptores. Un aptámero típico tiene un tamaño de 10-15 kDa (30-45 nucleótidos), se une a su diana con afinidad sub-nanomolar, y discrimina frente a dianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, los aptámeros no se unirán generalmente a otras proteínas de la misma familia de genes). Una serie de estudios estructurales han demostrado que los aptámeros son capaces de usar los mismos tipos de interacciones de unión (por ejemplo, puentes de hidrógeno, complementariedades electrostáticas, contactos hidrófobos, exclusión estérica) que dirigen la afinidad y especificidad en complejos anticuerpo-antígeno.

Los aptámeros tienen un número de características deseables para su uso como agentes terapéuticos y diagnósticos incluyendo alta especificidad y afinidad, eficacia biológica, y excelentes propiedades farmacocinéticas.

#### El método SELEX™

El método preferido para generar un aptámero, ilustrado de manera general en la Figura 2, es con un proceso titulado "Evolución Sistemática de Ligandos Mediante Enriquecimiento Exponencial" ("SELEX™" por sus siglas en inglés "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment"). El proceso SELEX™, un método para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión elevadamente específica para moléculas diana, se describe en, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos con número de serie 07/536.428, presentada el 11 de junio de 1990, actualmente abandonada, la patente de los Estados Unidos N° 5.475.096 titulada "Nucleic Acid Ligands", y la patente de los Estados Unidos N° 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813) titulado "Nucleic Acid Ligands". Efectuando ciclos iterativos de selección y amplificación, SELEX™ puede usarse para obtener aptámeros, también citados en el presente documento como "ligandos de ácido nucleico" con cualquier nivel deseado de afinidad de unión a la diana.

El proceso SELEX™ se basa en la revelación única de que los ácidos nucleicos tienen suficiente capacidad para



formar varias estructuras en dos y tres dimensiones y suficiente versatilidad química disponible entre sus monómeros para actuar como ligandos (es decir, forman pares de unión específicos) con virtualmente cualquier compuesto químico, ya sea monomérico o polimérico. También pueden servir como diana moléculas de cualquier tamaño o composición.

El proceso SELEX™ se basa en la capacidad para unirse a una diana. Los aptámeros obtenidos mediante el procedimiento SELEX™ tendrán por tanto la propiedad de unión a la diana. Sin embargo, SELEX™ por sí mismo no selecciona otras propiedades del aptámero o diana y no se puede esperar de manera razonable que un aptámero derivado mediante SELEX™ tenga cualquier propiedad distinta de la unión a la diana deseada, aunque puede esperarse que los aptámeros obtenidos tengan otras propiedades. Por tanto, aunque pueda esperarse que un aptámero tenga un efecto particular sobre la diana, más allá de unirse a la diana, un aptámero dado puede no tener efectos, o puede tener varios efectos. Por ejemplo, cuando la diana es una proteína que interactúa con múltiples receptores de la superficie celular, un aptámero puede actuar ya sea para bloquear o para potenciar la unión entre la proteína y uno o más de dichos receptores, o puede no tener efecto en cualquiera de las interacciones. En otro ejemplo, la diana puede ser una especie catalítica, y un aptámero puede bloquear o potenciar la efectividad de la función catalítica o puede no tener efecto sobre la función catalítica. Sin embargo, antes de probar en un ensayo adecuado, el experto de en la técnica es incapaz de predecir qué propiedad, en caso de haberlas, tendrá de hecho un aptámero. De hecho, solo la unión a la diana no proporciona información sobre el efecto funcional, en caso de haberlo, que puede ejercerse sobre la diana mediante la unión del aptámero.

La alternación de una propiedad de la molécula diana necesita que el aptámero se una a una determinada localización sobre la diana para efectuar un cambio en una propiedad de la diana. En teoría, SELEX™ puede dar como resultado la identificación de un gran número de aptámeros, en los que cada aptámero se une a un sitio diferente sobre la diana. En la práctica, las interacciones de unión aptámero-diana a menudo suceden en uno o un número relativamente pequeño de sitios de unión preferidos sobre la diana que proporcionan interfaces estructurales estables y accesibles para la interacción. Además, cuando se efectúa SELEX™ sobre una molécula diana fisiológica, el experto habitual no es generalmente capaz de controlar la localización del aptámero a la diana. Por consiguiente, la localización del sitio de unión del aptámero sobre la diana puede ser o no en, o cerca de, uno de varios sitios de unión potenciales que pueden conducir al efecto deseado, o puede no tener efecto sobre la molécula diana.

Incluso donde el aptámero, a causa de su capacidad de unirse a la diana, se ve que tiene un efecto, no hay modo de predecir la existencia de ese efecto o de saber por adelantado cuál será ese efecto. Al efectuar un experimento SELEX™, el experto habitual solo podrá saber con cualquier certeza que los aptámeros, hasta el alcance que sea posible obtener un aptámero contra una diana, tendrá la propiedad de unirse a la diana. Se puede efectuar un experimento de SELEX™ con la esperanza de que alguno de los aptámeros identificados también tenga un efecto sobre la diana más allá de unirse a ella, pero esto es incierto.

El método SELEX™ se basa en un punto de partida sobre una biblioteca o grupo de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden secuencias aleatorizadas. Los oligonucleótidos pueden ser ADN modificado o no modificado, ARN, o híbridos de ADN/ARN. En algunos ejemplos, el grupo comprende oligonucleótidos 100 % al azar o parcialmente al azar. En otros ejemplos, el grupo comprende oligonucleótidos al azar o parcialmente al azar que contienen al menos una secuencia fija y/o secuencia conservada incorporada dentro de la secuencia aleatorizada. En otros ejemplos, el grupo comprende oligonucleótidos al azar o parcialmente al azar que contienen al menos una secuencia fija y/o secuencias conservadas en sus extremos 5' y/o 3' que pueden comprender una secuencia compartida por todas las moléculas del grupo de oligonucleótidos. Las secuencias fijas son secuencias comunes para oligonucleótidos en el grupo que se incorporan para un fin preseleccionado tal como, motivos CpG descritos en más detalle a continuación, 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 colas de poli A o poli T, núcleos catalíticos, sitios para 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 anteriormente descritas, compartidas por un número de aptámeros que se unen a la misma diana.

Los oligonucleótidos del grupo incluyen preferentemente una porción de secuencia aleatorizada así como secuencias fijas necesarias para una amplificación eficiente. Los oligonucleótidos del grupo de partida contienen normalmente secuencias fijas 5' y 3' terminal que bordean una región interna de 30-50 nucleótidos al azar. Los nucleótidos aleatorizados pueden producirse de un número de modos incluyendo la síntesis química y selección por tamaño a partir de ácidos nucleicos celulares escindidos al azar. La variación de secuencia en los ácidos nucleicos de ensayo también pueden introducirse o aumentarse mediante mutagénesis antes o durante las iteraciones de selección/amplificación.

La porción de secuencia al azar del oligonucleótido puede ser de cualquier longitud y puede comprender ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos y pueden incluir nucleótidos o análogos de nucleótidos modificados o no naturales. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos nº 5.958.691; la patente de los Estados Unidos nº 5.660.985; la patente de los Estados Unidos nº 5.958.691; la patente de los Estados Unidos nº 5.698.687; la patente

de los 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 oligonucleótidos unidos mediante enlaces fosfodiéster usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos de fase sólida bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Froehler et al., Nucl. Acid Res., 14:5399-5467 (1986) y Froehler et al., Tet. Lett. 27:5575-5578 (1986). Los oligonucleótidos al azar también pueden sintetizarse usando métodos en fase de solución, tales como métodos de síntesis de triéster. Véase, por ejemplo, Sood et al., Nucl. Acid Res., 4:2557 (1977) y Hirose et al., Tet. Lett., 28:2449 (1978). Las síntesis típicas efectuadas en un equipo de síntesis de ADN automatizado producen  $10^{14}$ - $10^{16}$  moléculas individuales, suficientes para la mayoría de los experimentos de SELEX™. Las regiones suficientemente grandes de secuencia al azar en el diseño de secuencia aumentan la probabilidad de que sea posible que cada molécula sintetizada represente una secuencia única.

La biblioteca de partida de oligonucleótidos puede generarse mediante síntesis química automatizada en un sintetizador de ADN. Para sintetizar secuencias aleatorizadas, se añaden mezclas de los cuatro nucleótidos en cada etapa de adición de nucleótido durante el proceso de síntesis, permitiendo la incorporación de nucleótidos al azar. Como se afirma anteriormente, en una realización, los oligonucleótidos al azar comprenden por completo secuencias al azar; sin embargo, en otras realizaciones, los oligonucleótidos al azar pueden comprender porciones de secuencias no aleatorias o parcialmente aleatorias. Las secuencias parcialmente aleatorias pueden crearse mediante la adición de los cuatro nucleótidos en diferentes proporciones molares en cada etapa de adición.

La biblioteca de oligonucleótidos de partida puede ser ARN, ADN, ARN o ADN sustituido o combinaciones de los mismos. En aquellos casos en los que se va a usar una biblioteca de ARN como librería de partida, se genera normalmente sintetizando una biblioteca de ADN, opcionalmente amplificando mediante PCR, después transcribiendo la biblioteca de ADN *in vitro* usando ARN polimerasa T7 o ARN polimerasas T7 modificadas, y purificando la secuencia transcrita. La biblioteca de ácido nucleico se mezcla a continuación con la diana en condiciones favorables para la unión y se someten a iteraciones de unión, particionado y amplificación paso a paso, usando el mismo esquema general de selección, para lograr virtualmente cualquier criterio deseado de afinidad de unión y selectividad. Más específicamente, comenzando con una mezcla que contiene el grupo de partida de ácidos nucleicos, el método SELEX™ incluye las etapas de: (a) poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión; (b) particionar los ácidos nucleicos no unidos de aquellos ácidos nucleicos que se han unido específicamente a moléculas diana; (c) disociar los complejos ácido nucleico-diana; (d) amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos ácido nucleico:diana para producir una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos; y (e) volver a iterar las etapas de unión, particionado, disociación y amplificación a lo largo de tantos ciclos como se deseen para producir ligandos de ácido nucleico elevadamente específicos de alta afinidad para la molécula diana. En aquellos casos donde se estén seleccionando aptámeros de ARN, el método SELEX™ comprende las etapas de: (i) retrotranscribir los ácidos nucleicos disociados de los complejos ácido nucleico-diana antes de la etapa de amplificación (d); y (ii) transcribir los ácidos nucleicos amplificados de la etapa (d) antes de volver a comenzar el proceso.

Dentro de una mezcla de ácidos nucleicos que contiene un gran número de secuencias y estructuras posibles, hay un gran intervalo de afinidades de unión para una diana dada. Aquellos que tengan la mayor afinidad de unión (menores constantes de disociación) por la diana son los que son más probables que se unan a la diana. Después del particionamiento, disociación y amplificación, se genera una segunda mezcla de ácido nucleico, enriquecida para los candidatos de mayor afinidad de unión. Los ciclos adicionales de selección favorecen de manera progresiva a los mejores ligandos hasta que la mezcla resultante de ácido nucleico esté compuesta predominantemente de solo una o unas pocas secuencias. Estas pueden clonarse, secuenciarse y ensayarse adicionalmente como ligandos o aptámeros para 1) afinidad de unión por la diana; y 2) capacidad para afectar a la función de la diana.

Los ciclos de selección y amplificación se repiten hasta que se logra una meta deseada. En el caso más general, la selección/amplificación continua hasta que no se logra una mejora significativa en la fuerza de unión tras la repetición del ciclo. El método se usa normalmente para muestrear aproximadamente  $10^{14}$  especies diferentes de ácidos nucleicos, pero puede usarse para muestrear hasta aproximadamente  $10^{18}$  especies de ácido nucleico deferentes. En general, las moléculas de aptámero de ácido nucleico se seleccionan en un procedimiento de 5 a 20 ciclos. En una realización, se introduce heterogeneidad solo en las etapas iniciales de selección y no sucede durante el proceso de replicación.

En una realización del método SELEX™, el proceso de selección es tan eficiente para aislar aquellos ligandos de ácido nucleico que se unen con más fuerza a la diana seleccionada, que solo se necesita un ciclo de selección y amplificación. Puede suceder una selección así de eficiente, por ejemplo, en un proceso de tipo cromatográfico en el que la capacidad de los ácidos nucleicos para asociarse con dianas unidas sobre una columna funciona de tal modo que la columna es suficientemente capaz de permitir la separación y aislamiento de los ligandos de ácido nucleico de la mayor afinidad.

En muchos casos, no es necesariamente deseable efectuar las etapas iterativas de SELEX™ hasta que se identifica un solo ligando de ácido nucleico. La solución de ligando de ácido nucleico específico de diana puede incluir una familia de estructuras de ácido nucleico o motivos que tengan un número de secuencias conservadas y un número de secuencias que pueden sustituirse o añadirse sin afectar de manera significativamente la afinidad de los ligandos

de ácido nucleico por la diana. Terminando el proceso SELEX™ antes de completarlo, es posible determinar la secuencia de un número de miembros de la familia de la solución de ligandos de ácido nucleico.

5 Se sabe que existen varias estructuras primarias, secundarias y terciarias de ácido nucleico. Las estructuras o motivos que se ha demostrado más comúnmente que están involucradas en las interacciones no de tipo Watson-Crick se citan como bucles en horquilla, protuberancias simétricas y asimétricas, pseudonudos e innumerables combinaciones de los mismos. Prácticamente todos los casos conocidos de dichos motivos sugieren que se pueden formar en una secuencia de ácidos nucleicos de no más de 30 nucleótidos. Por este motivo, a menudo se prefiere que los procedimientos SELEX™ con segmentos contiguos aleatorizados se inicien con secuencias de ácidos nucleicos que contiene segmentos aleatorizados de entre aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos y en algunas realizaciones, de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 nucleótidos. En un ejemplo, la secuencia 5'-fija:al azar:3'-fija comprende una secuencia al azar de aproximadamente 3 a aproximadamente 50 nucleótidos.

15 El método SELEX™ básico se ha modificado para lograr un número de objetivos específicos. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.707.796 describe el uso de SELEX™ en conjunción con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas, tales como ADN doblado. La Patente de los Estados Unidos N° 5.763.177 describe métodos basados en SELEX™ para seleccionar ligandos de ácido nucleico que contienen grupos fotorreactivos capaces de unirse y/o fotorreticularse a y/o fotoinactivar una molécula diana. La Patente de los Estados Unidos N° 5.567.588 y la Patente de los Estados Unidos N° 5.861.254 describen métodos basados en SELEX™ que logran un particionado elevadamente eficiente entre oligonucleótidos que tienen alta y baja afinidad por una molécula diana. La Patente de los Estados Unidos N° 5.496.938 describe métodos para obtener ligandos de ácido nucleico mejorados después de haber efectuado el proceso SELEX™. La Patente de los Estados Unidos N° 5.705.337 describe métodos para unir covalentemente un ligando a su diana.

25 También puede usarse SELEX™ para obtener ligandos de ácido nucleico que se unen a más de un sitio sobre la molécula diana, y para obtener ligandos de ácido nucleico que incluyen especies de no de ácido nucleico que se unen a sitios específicos sobre la diana. SELEX™ proporciona medios para aislar e identificar ligandos de ácido nucleico que se unen a cualquier diana previsible, incluyendo biomoléculas grandes y pequeñas, tales como proteínas de unión a ácidos nucleicos y proteínas no conocidas por unirse a ácidos nucleicos como parte de su función biológica, así como cofactores y otras moléculas pequeñas. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.580.737 divulga secuencias de ácido nucleico identificadas mediante SELEX™ que son capaces de unirse con elevada afinidad a cafeína y el análogo elevadamente relacionado, teofilina.

35 Contra-SELEX™ es un método para mejorar la especificidad de ligandos de ácido nucleico para una molécula diana eliminando las secuencias de ligando de ácido nucleico con reactividad cruzada para una o más moléculas no diana. Contra-SELEX™ comprende las etapas de: (a) preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos; (b) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen una afinidad de unión por la diana en relación a la mezcla candidata pueden particionarse a partir del resto de la mezcla candidata; (c) particionar los ácidos nucleicos de afinidad aumentada a partir del resto de la mezcla candidata; (d) disociar los ácidos nucleicos de afinidad aumentada de la diana; (e) poner en contacto los ácidos nucleicos de afinidad aumentada con una o más moléculas no diana de tal forma que los ligandos de ácido nucleico con afinidad específica por la molécula (o moléculas) no diana se eliminan; y (f) amplificar los ácidos nucleicos con afinidad específica solo por la molécula diana para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida para secuencias de ácido nucleico con una afinidad y especificidad relativamente mayor por la unión a la molécula diana. Como se describe anteriormente para SELEX™, los ciclos de selección y amplificación se repiten según sea necesario hasta que se logra una meta deseada.

50 Un problema potencial encontrado en el uso de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos, agentes diagnósticos, y vacunas es que los oligonucleótidos en su forma de fosfodiéster pueden degradarse rápidamente en los fluidos corporales mediante enzimas intracelulares y extracelulares, tales como endonucleasas y exonucleasas antes de que se manifieste el efecto deseado. El método SELEX™, por tanto, abarca la identificación de ligandos de ácido nucleico de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas sobre el ligando, tales como estabilidad *in vivo* mejorada o características de administración mejoradas. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones del azúcar y/o del fosfato y/o de la base. Los ligandos de ácido nucleico identificados mediante SELEX™ se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n° 5.660.985, que describe oligonucleótidos que contiene derivados de nucleótido modificados químicamente en la posición 2' de la ribosa, posición 5 de pirimidinas, y en la posición 8 de purinas, la Patente de los Estados Unidos N° 5.756.703 que describe oligonucleótidos que contiene varias pirimidinas modificadas en 2', y la Patente de los Estados Unidos N° 5.580.737 que describe ligandos de ácido nucleico elevadamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con sustituyentes 2'-amino (2'-NH<sub>2</sub>), 2'-fluoro (2'-F), y/o 2'-O-metilo (2'-OMe).

65 Las modificaciones de los ligandos de ácido nucleico contempladas en esta invención incluyen, pero sin limitación, aquellas que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, capacidad de polarización, hidrofobicidad, puentes de hidrógeno, interacción electrostática, y fluxionalidad para las bases de ligando de ácido nucleico o para el ligando de ácido nucleico en su conjunto. Las modificaciones para generar poblaciones de

oligonucleótidos que son resistentes a nucleasas también pueden incluir una o más uniones internucleótido sustitutas, azúcares alterados, bases alteradas, o una de sus combinaciones. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificaciones de azúcar en posición 2', modificaciones de pirimidina en posición 5, modificaciones de purina en posición 8, modificaciones en aminos exocíclicos, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo; modificaciones de estructura, modificaciones de fosforotioato o fosfato de alquilo, metilaciones, y combinaciones de emparejamiento de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanosina. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5', tales como taponado, por ejemplo, adición de un tapón 3'-3'-dT para aumentar la resistencia a exonucleasas (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 5.674.685; 5.668.264; 6.207.816; y 6.229.002).

En una realización, se proporcionan oligonucleótidos en los que el grupo P(O)O se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), P(O)NR<sub>2</sub> ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> ("formacetal") o 3'-amina (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o sin sustituir. Los grupos de enlace pueden unirse a nucleótidos adyacentes mediante un engarce -O-, -N-, o -S-. No se necesita que todos los engarces en el oligonucleótido sean idénticos.

En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos comprenden grupos azúcar modificados, por ejemplo, uno o más de los grupos hidroxilo se reemplazan con halógeno, grupos alifáticos, o se funcionalizan como éteres o aminos. En una realización, la posición 2' del resto de furanosa se sustituye por cualquiera de grupo O-metilo, O-alquilo, O-alilo, S-alquilo, S-alilo, o halo. Los métodos de síntesis de azúcares modificados en 2' se describen, por ejemplo, en Sproat, et al., Nucl. Acid Res., 19:733-738.

(1991); Cotten, et al., Nucl. Acid Res., 19:2629-2635 (1991); y Hobbs, et al., Biochemistry 12:5138-5145 (1973). Se conocen otras modificaciones para un experto habitual en la materia. Dichas modificaciones pueden ser modificaciones antes del proceso SELEX™ o modificaciones después del proceso SELEX™ (modificaciones de ligandos no modificados previamente identificados) o pueden efectuarse mediante la incorporación en el proceso SELEX™.

Las modificaciones antes del proceso SELEX™ o aquellas efectuadas mediante incorporación en el proceso SELEX™ producen ligandos de ácido nucleico con especificada para su diana de SELEX™ y estabilidad mejorada, por ejemplo, estabilidad *in vivo*. Las modificaciones después del proceso SELEX™ efectuadas sobre ligandos de ácido nucleico pueden dar como resultado estabilidad mejorada, por ejemplo, estabilidad *in vivo* sin afectar de manera negativa a la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico. El método SELEX™ abarca combinar oligonucleótidos seleccionados con otros oligonucleótidos seleccionados y unidades funcionales no de oligonucleótido como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.637.459 y la Patente de los Estados Unidos Nº 5.683.867. El método SELEX™ abarca además combinar ligandos de ácido nucleico seleccionados con compuestos de elevado peso molecular lipófilos o no inmunogénicos en un complejo diagnóstico o terapéutico, como se ha descrito, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos nº 6.011.020, La patente de Estados Unidos Nº 6.051.698, y en la publicación PCT Nº WO 98/18480. Estas patentes y solicitudes enseñan la combinación de un amplio abanico de formas y otras propiedades, con las eficientes propiedades de amplificación y replicación de oligonucleótidos, y con las propiedades deseables de otras moléculas.

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

Los aptámeros con especificidad y afinidad de unión a la diana (o dianas) de complemento de la presente invención se seleccionan normalmente mediante el proceso SELEX™ como se describe en el presente documento. Adicionalmente, pueden efectuarse selecciones con secuencias que incorporan nucleótidos modificados para estabilizar las moléculas de aptámero contra la degradación *in vivo*.

#### SELEX™ 2' modificado

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

Los grupos 2'-fluoro y 2'-amino se han incorporado con éxito en grupos de oligonucleótidos a partir de los cuales a continuación se han seleccionado aptámeros. Sin embargo, estas modificaciones aumentan en gran medida el coste de la síntesis del aptámero resultante, y pueden introducir preocupaciones respecto a la seguridad en algunos casos porque la posibilidad de que los nucleótidos modificados puedan reciclarse en ADN huésped mediante degradación

de los oligonucleótidos modificados y uso posterior de los nucleótidos como sustratos para la síntesis de ADN.

Los aptámeros que contienen nucleótidos de 2'-O-metilo ("2'-OMe"), tal como se proporcionan en el presente documento, superan muchos de estos inconvenientes. Los oligonucleótidos que contienen nucleótidos de 2'-OMe son resistentes a nucleasas y baratos de sintetizar. Aunque los nucleótidos de 2'-OMe son ubicuos en los sistemas biológicos, las polimerasas naturales no aceptan NTP de 2'-OMe como sustratos en condiciones fisiológicas, por lo tanto, no hay preocupaciones en cuanto a la seguridad sobre el reciclado de nucleótidos de 2'-OMe en ADN huésped. Los métodos SELEX™ usados para generar aptámeros modificados en 2' se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos con N° de Serie 60/430.761, presentada el 3 de Diciembre de 2002 (US 2004/0197804 y US 2005/0037394), la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos con N° de Serie 60/487.474, presentada el 15 de julio de 2003 (US 2004/0197804 y US 2005/0037394), Solicitud Provisional de Patente de Estados Unidos con N° de serie 60/517.039 presentada el 4 de noviembre de 2003 (US 2004/0197804 y US 2005/0037394), la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 10/729.381, presentada el 3 de Diciembre de 2003 (US 2004/0197804 y US 2005/0037394), la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 10/873.856, presentada el 21 de junio de 2004 (US 2004/0197804 y US 2005/0037394), titulada "Method for in vitro Selection of 2'-O-methyl Substituted Nucleic Acids", la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos con N° de Serie 60/696.292, presentada el 30 de junio de 2005 (WO 07/005645), titulada "Improved Materials and Methods for the Generation of Fully 2'-Modified Containing Nucleic Acid Transcripts" y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 11/480.188 (US 2007/0117112) presentada el 30 de junio de 2006 titulada "Materials and Methods for the Generation of Fully 2'-Modified Containing Nucleic Acid Transcripts".

La presente invención incluye aptámeros que se unen a y modulan la función de una diana de complemento que contiene nucleótidos modificados (por ejemplo, nucleótidos que tienen una modificación en la posición 2') para preparar el oligonucleótido más estable que el oligonucleótido no modificado a degradación enzimática o química así como a degradación térmica y física. En una realización preferida, dicha diana de complemento es proteína de complemento C5. Aunque hay varios ejemplos de aptámeros que contiene 2'-OMe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Green et al., *Current Biology* 2, 683-695, 1995) estos se generaron mediante la selección *in vitro* de bibliotecas de transcritos modificados en los que los restos de C y U se sustituyeron con 2'-fluoro (2'-F) y los restos de A y G fueron 2'-OH. Una vez que se identificaron secuencias funcionales, se ensayó la tolerancia de cada resto A y G a sustitución 2'-OMe, y se volvió a sintetizar el aptámero que tenía todos los restos A y G que toleraron sustitución 2'-OMe como restos 2'-OMe. La mayoría de restos de A y G de los aptámeros generados de este modo en dos etapas toleran la sustitución con restos 2'-OMe, aunque, de media, aproximadamente el 20 % no. En consecuencia, los aptámeros generados usando este método tienden a contener desde dos hasta cuatro restos 2'-OH, y en consecuencia se comprometen la estabilidad y coste de la síntesis. Mediante la incorporación de nucleótidos modificados en la reacción de transcripción que genera oligonucleótidos estabilizados usados en grupos de oligonucleótidos a partir de los cuales se seleccionan y enriquecen los aptámeros mediante SELEX™ (y/o cualquiera de sus variaciones y mejoras, incluyendo las descritas en el presente documento), los métodos de la presente invención eliminan la necesidad de estabilizar los oligonucleótidos de aptámero seleccionados (por ejemplo, volviendo a sintetizar los nucleótidos de aptámero con nucleótidos modificados).

En una realización, la presente invención proporciona aptámeros que comprenden combinaciones de modificaciones 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi y 2'-OMe de los nucleótidos de ATP, GTP, CTP, TTP y UTP. En otra realización, la presente invención proporciona aptámeros que comprenden combinaciones de modificaciones 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH<sub>2</sub>, y 2'-metoxietilo de los nucleótidos de ATP, GTP, CTP, TTP y UTP. En otra realización, la presente invención proporciona aptámeros que comprenden 5<sub>6</sub> combinaciones de modificaciones 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH<sub>2</sub>, y 2'-metoxietilo de los nucleótidos de ATP, GTP, CTP, TTP y UTP. En una realización preferida, la presente invención proporciona aptámeros que comprenden todos o sustancialmente todos los nucleótidos de ATP, GTP, CTP, TTP y/o UTP modificados con 2'-OMe.

Los aptámeros modificados en 2' de la invención pueden seleccionarse usando polimerasas modificadas, por ejemplo, una polimerasa T7 modificada, que tiene una tasa de incorporación de nucleótidos modificados que tienen sustituyentes voluminoso en la posición 2' de furanosa que es mayor que la de las polimerasas de tipo silvestre. Por ejemplo, una polimerasa T7 mutante en la que el resto de tirona en la posición 639 se ha cambiado por fenilalanina (Y639F) utiliza fácilmente (incorpora) trifosfatos de nucleótido 2'-desoxi, 2'-amino-, y 2'-fluoro- (NTP) pero no NTP con sustituyentes 2' voluminoso tales como sustituyentes 2'-OMe o 2'-azido (2'-N<sub>3</sub>). Para la incorporación de sustituyentes 2' voluminoso, se ha descrito una polimerasa T7 mutante que tiene la histidina en la posición 784 cambiada por un resto de alanina además de la mutación Y639F (Y639F/H784A) se ha usado en circunstancias limitadas para incorporar NTP modificados con pirimidina. Véase Padilla, R. y Sousa, R., *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(24): 138. Una polimerasa de ARN T7 mutante en la que se ha cambiado un resto de tirosina en la posición 639 a fenilalanina, el resto de histidina en la posición 784 se ha cambiado a una alanina, y el resto de lisina en la posición 378 se ha cambiado a arginina (Y639F/H784A/K378R) se ha usado en circunstancias limitadas para incorporar NTP de purina y pirimidina modificados, por ejemplo, NTP de 2'-OMe, pero necesita un pico de GTP 2'-OH para la transcripción. Véase Burmeister et al., (2005) *Chemistry and Biology*, 12: 25-33. Aunque no se desea estar unidos a teoría alguna, las mutaciones K378R no está cerca del sitio activo de la polimerasa y por tanto se cree que es una mutación silente, que no tiene efecto sobre la incorporación de NTP modificados con 2'-OMe. También se ha descrito una polimerasa T7 mutante que tiene la histidina en la posición 784 cambiada a un resto de alanina

(H784A). Padilla et al., *Nucleic Acids Research*, 2002, 30: 138. Tanto en el mutante Y639F/H784A como en el mutante H784A de polimerasas T7, el cambio a un resto de aminoácido más pequeño, tal como alanina, permite la incorporación de sustratos de nucleótido más voluminosos, por ejemplo, nucleótidos sustituidos por 2'-OMe. Véase Chelliserry, K. y Ellington, A.D., (2004) *Nature Biotech.* 9:1155-60. Se han descrito ARN polimerasas T7 adicionales con mutaciones en sitio activo de la ARN polimerasa T7 que incorporan más fácilmente sustratos modificados con 2' voluminosos, por ejemplo, una ARN polimerasa T7 mutante que tiene un resto de tirosina en la posición 639 cambiado a leucina (Y639L).

En general, se ha descubierto que en las condiciones descritas en el presente documento, el mutante Y639F puede usarse para la incorporación de todos los NTP sustituidos con 2'-OMe excepto GTP y las ARN polimerasas T7 mutantes Y639F/H784A, Y639F/H784A/K378R, Y639L/H784A, Y639L/H784A/K378R, Y639L, Y639L/K378R, P266L/Y639L/H784A o la P266L/Y639L/H784A/K378R pueden usarse en las condiciones divulgadas en el presente documento para la incorporación de todos los NTP sustituidos con 2'-OMe incluyendo GTP 2'-OMe.

Los oligonucleótidos modificados en 2' pueden sintetizarse por completo de nucleótidos modificados, o con un subconjunto de nucleótidos modificados. Las modificaciones pueden ser las mismas o diferentes. Pueden modificarse algunos o todos los nucleótidos, y aquellos que están modificados pueden contener la misma modificación. Pueden modificarse algunos o todos los nucleótidos, y aquellos que están modificados pueden contener diferentes modificaciones, por ejemplo, todos los nucleótidos que contienen la misma base pueden tener un tipo de modificación, mientras que los nucleótidos que contienen otras bases pueden tener diferentes tipos de modificación. Todos los nucleótidos de purina tienen un tipo de modificación (o están sin modificar), mientras que todos los nucleótidos de pirimidina tienen otro tipo diferente de modificación (o están sin modificar). De este modo, los transcritos, o grupos de transcritos se generan usando cualquier combinación de modificaciones, incluyendo, por ejemplo, ribonucleótidos (2'-OH), desoxirribonucleótidos (2'-desoxi), nucleótidos de 2'-amina (2'-NH<sub>2</sub>), nucleótidos de 2'-fluro (2'-F), y nucleótidos de 2'-O-metilo (2'-OMe). Se cita una mezcla de transcripción que contiene 2'-OH A y G y 2'-F C y U como mezcla "rRfY" y los aptámeros seleccionados de esta se citan como aptámeros de "rRfY". Se cita una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe C y U y 2'-OH A y G como mezcla "rRmY" y los aptámeros seleccionados de esta se citan como aptámeros de "rRmY". Se cita una mezcla de transcripción que contiene desoxi A y G y 2'-OMe U y C como mezcla "dRmY" y los aptámeros seleccionados de esta se citan como aptámeros de "dRmY". Se cita una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe A, C y U y 2'-OH G como mezcla "rGmH" y los aptámeros seleccionados de esta se citan como aptámeros de "rGmH". Se cita una mezcla de transcripción alternativa que contiene 2'-OMe A, C, U y G y 2'-OMe A, U y C y 2'-F G como "mezcla alternativa" y los aptámeros seleccionados de esta se citan como aptámeros de "mezcla alternativa". Se cita una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe A, U, C y G, en donde hasta el 10 % de las G son ribonucleótidos como una mezcla "r/mGmH" y los aptámeros seleccionados de esta se citan como aptámeros de "r/mGmH". Se cita una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe A, U y C y 2'-F G como mezcla "fGmH" y los aptámeros seleccionados de esta se citan como aptámeros de "fGmH". Se cita una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe A, U y C y desoxi G como mezcla "dGmH" y los aptámeros seleccionados de esta se citan como aptámeros de "dGmH". Se cita una mezcla de transcripción que contiene desoxi A y 2'-OMe C, G y U como una mezcla "dAmB" y los aptámeros seleccionados de esta se citan como aptámeros de "dAmB", y se cita una mezcla de transcripción que contiene todos los nucleótidos 2'-OH como una mezcla "rN" y los aptámeros seleccionados de esta se citan como aptámeros de "rN", "rRrY" o de "ARN". Se cita una mezcla de transcripción que contiene 2'-OH adenosin trifosfato y guanosa trifosfato y desoxicitidin trifosfato y timidin trifosfato como mezcla rRdY y los aptámeros seleccionados de esta se citan como aptámeros de "rRdY". Un aptámero de "mRmY" también citado como aptámero de "MNA" es uno que contiene solo 2'-O-metil nucleótidos excepto para el nucleótido de partida, que es 2'-OH guanosa o cualquier guanosa de tipo silvestre, y puede derivarse de un oligonucleótido de r/mGmH mediante reemplazo después de SELEX™, cuando sea posible, de cualquier 2'-OH G con 2'-OMe G. Como alternativa, pueden identificarse los aptámeros de mRmY mediante SELEX™ de mRmY.

Una realización preferida incluye cualquier combinación de nucleótidos 2'-OH, 2'-desoxi y 2'-OMe. Una realización más preferida incluye cualquier combinación de nucleótidos 2'-desoxi y 2'-OMe. Una realización aún más preferida es con cualquier combinación de nucleótidos 2'-desoxi y 2'-OMe en los que las pirimidinas son 2'-OMe (tales como dRmY, mRmY o dGmH).

La incorporación de nucleótidos modificados en aptámeros de la invención se efectúa antes del proceso de (pre-) selección (por ejemplo, una modificación antes del proceso SELEX™). De manera opcional, los aptámeros de la invención en los que se han incorporado nucleótidos modificados mediante modificación antes del proceso SELEX™ pueden modificarse adicionalmente mediante un proceso de modificación después de SELEX™ (es decir, una modificación después de proceso SELEX™ después de SELEX™). Las modificaciones antes del proceso SELEX™ producen ligandos de ácido nucleico modificados con especificidad por la diana de SELEX™ y también estabilidad *in vivo* mejorada. Las modificaciones después del proceso SELEX™, es decir, modificación (por ejemplo, truncamiento, deleción, sustitución o modificaciones adicionales de nucleótidos de ligandos previamente identificados que tienen nucleótidos incorporados mediante modificaciones antes del proceso SELEX™) pueden dar como resultado una mejora adicional de estabilidad *in vivo* sin afectar de manera adversa a la capacidad de unión del ligando de ácido nucleico que tiene nucleótidos incorporados mediante una modificación antes del proceso SELEX™.

Para generar grupos de ARN modificados en 2' (por ejemplo, 2'-OMe) en condiciones en las cuales una polimerasa

acepta NTP modificados en 2' pueden usarse todos los mutantes de ARN polimerasa T7 Y693F, Y693F/K378R, Y693F/H784A, Y693F/H784A/K378R, Y693L/H784A, Y693L/H784A/K378R, Y639L, Y639L/K378R, P266L/Y639L/H784A y P266L/Y639L/H784A/K378R. También pueden usarse otras ARN polimerasa T7, en particular aquellas que muestran una elevada tolerancia por sustituyentes 2'- voluminosos, en la presente invención.

5 Cuando se usa en una polimerización dirigida por patrón usando las condiciones divulgadas en el presente documento, pueden usarse los mutantes de ARN polimerasa T7 Y639L/H784A, Y639L/H784A/K378R, P266L/Y639L/H784A o P266L/Y639L/H784A/ K378R para la incorporación de todos los NTP modificados en 2'-OMe, incluyendo 2'-OMe GTP, con mayores producciones de transcrito de las que se logran usando las ARN polimerasas T7 mutantes Y639F, Y639F/K378R, Y639F/H784A, Y639F/H784A/K378R, Y639L, Y639L/K378R. Las ARN polimerasas T7 mutantes Y639L/H784A, Y639L/H784A/K378R, P266L/Y639L/H784A y P266L/Y639L/H784A/ K378R pueden usarse con, pero no necesitan a 2'-OH GTP para lograr altas producciones de oligonucleótidos modificados en 2', por ejemplo, que contienen 2'-OMe.

15 Otras polimerasas, en particular aquellas que muestran una alta tolerancia para sustituyentes de 2' voluminosos, también pueden usarse en la presente invención. Puede explorarse esta capacidad para dichas polimerasas ensayando su capacidad para incorporar nucleótidos modificados en las condiciones de transcripción divulgadas en el presente documento.

20 Se ha determinado que un número de factores son importantes para las condiciones de transcripción útiles en los métodos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, una secuencia líder incorporada en la secuencia fija en el extremo 5' de un molde de transcripción de ADN puede ser importante para aumentar las producciones de transcritos modificados cuando se usan para la transcripción las ARN polimerasas T7 mutantes Y639F/K378R o Y639F/H784A/K378R, por ejemplo, en las condiciones de transcripción de dRmY o r/mGmH descritas más adelante. Adicionalmente, puede usarse una secuencia líder, pero no es necesaria para ayudar a aumentar la producción de transcrito modificado cuando, por ejemplo, se usa la ARN polimerasa T7 mutante Y639L/H784A o Y639L/H784A/K378R, por ejemplo, en las condiciones de transcripción de mRmY descritas más adelante. La secuencia líder es normalmente de 6-15 nucleótidos de longitud, y puede estar compuesta de purinas, o una mezcla de nucleótidos de purina y pirimidina.

30 Otro factor importante en la obtención de transcritos que incorporan nucleótidos modificados es la presencia o concentración de 2'-OH guanosina (por ejemplo, GMP, GTP, u otro no 2'-OMe no trifosfato). La transcripción puede dividirse en dos fases: la primera fase es iniciación, durante la cual se añade un NTP al extremo 3'-hidroxilo de GTP (o GMP, u otro no 2'-OMe no trifosfato) para producir un dinucleótido que se extiende a continuación en aproximadamente 10-12 nucleótidos; la segunda fase es la elongación, durante la cual la transcripción procede más allá de la adición de aproximadamente los primeros 10-12 nucleótidos. Se ha descubierto que pequeñas cantidades de 2'-OH GTP (o GMP, u otro no 2'-OMe no trifosfato) 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 (o GMP, guanosina, u otro no 2'-OMe no trifosfato). Por lo tanto, por ejemplo, una mezcla de transcripción dRmY (que contiene desoxipurinas y 2'-OMe pirimidinas) necesita la adición de una pequeña cantidad de GMP para permitir que la polimerasa inicie la transcripción, mientras en una mezcla de transcripción de r/mGmH (que contiene hasta un 10 % de 2'-OH GTP), una pequeña cantidad de GMP puede añadirse a una mezcla de transcripción, pero no es necesaria para permitir que la polimerasa inicie la transcripción, ya que 2'-OH GTP ya está presente en la mezcla de transcripción. Una vez que 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 frente a 2'-OH GTP permite la incorporación de principalmente el 2'-OMe GTP.

50 Como se describe inmediatamente antes, cebar la transcripción con 2'-OH guanosina (por ejemplo, GMP, GTP u otro no 2'-OMe no trifosfato) es importante. Este efecto es el resultado de la especificidad de la polimerasa por el nucleótido iniciador. Como resultado, el nucleótido en 5'-terminal de cualquier transcrito generado de este modo es probable que sea 2'-OH G. La concentración preferida de GMP es 0,5 mM y aún más preferentemente, 1 mM. También se ha descubierto que incluyendo PEG, preferentemente PEG-8000, en la reacción de transcripción es útil para maximizar la incorporación de nucleótidos modificados.

55 Otro factor importante en la incorporación de nucleótidos sustituidos con 2'-OMe en los transcritos es el uso tanto de magnesio divalente como de manganeso en la mezcla de transcripción. Se ha descubierto que diferentes combinaciones de concentraciones de cloruro de magnesio y cloruro de manganeso afectan a los rendimientos de transcritos 2'-O-metilados, siendo la concentración óptima de cloruro de magnesio y de manganeso dependiente de la concentración de NTP en la mezcla de reacción con los que los iones metálicos forman complejos. Para obtener los máximos rendimientos de todos los transcritos 2'-O-metilados (es decir, todas las 2'-OMe A, C, y U y aproximadamente un 90 % de nucleótidos de G), se prefieren concentraciones de aproximadamente 5 mM de cloruro de magnesio y 1,5 mM de cloruro de manganeso cuando cada NTP está presente a una concentración de 0,5 mM. Cuando la concentración de cada NTP es 1,0 mM, se prefieren concentraciones de aproximadamente 6,5 nM de cloruro de magnesio y 2,0 mM de cloruro de manganeso. Cuando la concentración de cada NTP es 2,0 mM, se prefieren concentraciones de aproximadamente 9,6 nM de cloruro de magnesio y 2,9 mM de cloruro de manganeso. En cualquier caso, desviaciones de estas concentraciones de hasta el doble aún proporcionan cantidades significativas de transcritos modificados.

En algunas realizaciones es ventajoso cebar la transcripción con GMP o guanosina. Este efecto es el resultado de la especificidad de la polimerasa por el nucleótido iniciador. Como resultado, el nucleótido en 5'-terminal de cualquier transcrito generado de este modo es probable que sea 2'-OH G. La concentración preferida de GMP (o guanosina) es 0,5 mM y aún más preferentemente, 1 mM. También se ha descubierto que incluyendo PEG, preferentemente PEG-8000, en la reacción de transcripción es útil para maximizar la incorporación de nucleótidos modificados.

Para la incorporación máxima de 2'-OMe ATP (100 %), UTP (100 %), CTP (100 %) y GTP (~90 %) ("r/mGmH") en los transcritos se prefieren las siguientes condiciones: Tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (6,5 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe NTP es 1,0 mM), MnCl<sub>2</sub> 1,5 mM (2,0 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe NTP es 1,0 mM), 2'-OMe NTP (cada uno) 500 μM (más preferentemente, 1,0 mM, 2'-OH GTP 30 μM, 2'-OH GMP 500 μM, pH 7,5, 15 unidades/ml de ARN polimerasa T7 Y639F/H784A, 5 unidades/ml de fosfatasa inorgánica, y una secuencia líder enteramente de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud. Como se usa en el presente documento, una unidad de 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 necesaria para incorporar 1 nmol de 2'-OMe NTP es 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.

Para una incorporación máxima (100 %) de 2'-OH GTP y 2'-OMe ATP, UTP y CTP ("rGmH") en los transcritos se prefieren las siguientes condiciones: Tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (9,6 mM cuando la concentración de cada NTP es 2,0 mM), MnCl<sub>2</sub> 1,5 mM (2,9 mM cuando la concentración de cada NTP es 2,0 mM), NTP (cada uno) 500 μM (más preferentemente, 2,0 mM, 2'-OH GMP 1 mM, pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F/K378R 200 nM, 5 unidades/ml de fosfatasa inorgánica, y una secuencia líder enteramente de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud.

Para la incorporación máxima de 2'-OMe ATP (100 %), 2'-OMe UTP (100 %), 2'-OMe CTP (100 %) y 2'-OMe GTP (100 %) ("mRmY" o "MNA") en transcritos se prefieren las siguientes condiciones: Tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl<sub>2</sub> 8 mM, MnCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 2'-OMe NTP (cada uno) 1,5 mM, 2'-OH GMP 1 mM, pH 7,5, ARN polimerasa T7 mutante Y639L/H784A/K378R 200 nM, 5 unidades/ml de fosfatasa inorgánica, y una secuencia líder opcional que aumente la producción de transcripción en las condiciones de transcripción derivadas. En una realización, la secuencia líder opcional es una secuencia líder enteramente de purina. En otra realización, la secuencia líder opcional es una mezcla de purinas y pirimidinas.

Para una incorporación máxima (100 %) de 2'-OH ATP y GTP, y 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 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (9,6 mM cuando la concentración de cada NTP es 2,0 mM), MnCl<sub>2</sub> 1,5 mM (2,9 mM cuando la concentración de cada NTP es 2,0 mM), NTP (cada uno) 500 μM (más preferentemente, 2,0 mM, 2'-OH GMP 1 mM, pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F/H784A/K378R 200 nM, 5 unidades/ml de fosfatasa inorgánica, y una secuencia líder enteramente de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud.

Para la incorporación máxima (100 %) de 2'-OMe ATP, UTP y CTP ("rGmH") en los transcritos se prefieren las siguientes condiciones: Tampón HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (9,6 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe NTP es 2,0 mM), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (2,9 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe NTP es 2,0 mM), 2'-OMe NTP (cada uno) 500 μM (más preferentemente, 2,0 mM, pH 7,5, 15 unidades/ml de ARN polimerasa T7 Y639F, 5 unidades/ml de fosfatasa inorgánica, y una secuencia líder enteramente de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud.

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 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (9,6 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe NTP es 2,0 mM), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (2,9 mM cuando la concentración de cada 2'-OMe NTP es 2,0 mM), 2'-OMe NTP (cada uno) 500 μM (más preferentemente, 2,0 mM, pH 7,5, 15 unidades/ml de ARN polimerasa T7 Y639F/H784A, 5 unidades/ml de fosfatasa inorgánica, y una secuencia líder enteramente de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud.

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 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl<sub>2</sub> 9,6 mM, MnCl<sub>2</sub> 2,9 mM, NTP (cada uno) 2,0 mM, 2'-OH GMP 1 mM, pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F/K378R 200 nM, 5 unidades/ml de fosfatasa inorgánica, y una secuencia líder enteramente de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud.

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 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl<sub>2</sub> 9,6 mM, MnCl<sub>2</sub> 2,9 mM, 2'-OMe NTP (cada uno) 2,0 mM, 2'-OH GMP 1 mM, pH 7,5, ARN polimerasa T7 Y639F/K378R 200 nM, 5 unidades/ml de fosfatasa inorgánica, y una secuencia líder enteramente de purina de al menos 8 nucleótidos de longitud.





comprenden sustancialmente todos 2'-desoxi adenosina, 2'-desoxi guanosina, 2'-O-metil citidina, y 2'-O-metil uridina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente invención comprenden una secuencia donde al menos el 80% de todos los nucleótidos de adenosina 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 de la presente invención comprenden una secuencia donde 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 una realización lo más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente invención comprenden una secuencia donde 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.

En condiciones de transcripción de rGmH, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-OH guanosin trifosfatos, 2'-OMe citidin trifosfatos, 2'-OMe uridin trifosfatos, y 2'-OMe adenosin trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción de rGmH de la presente invención comprende 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 donde 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 donde al menos el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH guanosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-OMe citidina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-OMe uridina, y al menos el 90% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-OMe adenosina. En una realización lo más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde 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'-O-metil adenosina.

En condiciones de transcripción de r/mGmH, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-O-metil adenosin trifosfato, 2'-O-metil citidin trifosfato, 2'-O-metil guanosin trifosfato, 2'-O-metil uridin trifosfato y 2'-OH guanosin trifosfato. Los oligonucleótidos modificados resultantes producidos usando las mezclas de transcripción de r/mGmH de la presente invención comprende sustancialmente todos 2'-O-metil adenosina, 2'-O-metil citidina, 2'-O-metil guanosina, y 2'-O-metil 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 de r/mGmH resultantes de la presente invención comprenden una secuencia donde al menos el 80% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil adenosina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil citidina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil guanosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil 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 donde al menos el 90% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil adenosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil citidina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil guanosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil uridina, y no más de aproximadamente el 10 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH guanosina. En una realización lo más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil citidina, el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil guanosina, y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil uridina, y no más de aproximadamente el 10 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-OH guanosina.

En condiciones de transcripción de mRmY (también citadas en el presente documento como MNA), la mezcla de transcripción comprende solo 2'-O-metil adenosin trifosfato, 2'-O-metil citidin trifosfatos, 2'-O-metil guanosin trifosfato, 2'-O-metil uridin trifosfato. Los oligonucleótidos modificados resultantes producidos usando la mezcla de transcripción mRmY de la presente invención comprenden una secuencia donde el 100 % de los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil citidina, el 100 % de los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil guanosina (excepto para la primera guanosina del oligonucleótido), y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil uridina.

En condiciones de transcripción de fGmH, la mezcla de reacción de transcripción comprende 2'-O-metil adenosin trifosfatos, 2'-O-metil uridin trifosfatos, 2'-O-metil citidin trifosfatos, y 2'-F guanosin trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las condiciones de transcripción de fGmH de la presente invención comprenden sustancialmente todos 2'-O-metil adenosina, 2'-O-metil uridina, 2'-O-metil citidina, y 2'-F guanosina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde al menos el 80% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil adenosina, al menos el 80% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil uridina, 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 guanosina son 2'-F guanosina, En una realización más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde al menos el 90% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil adenosina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil uridina, 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 guanosina son 2'-F guanosina, En una realización lo más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-O-metil adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil uridina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil citidina, y el 100% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-F guanosina.
- En condiciones de transcripción de dAmB, los fosfatos, 2'-O-metil citidin trifosfatos, 2'-O-metil guanosin trifosfatos, y 2'-O-metil uridin trifosfatos. Los oligonucleótidos modificados producidos usando las mezclas de transcripción de dAmB de la presente invención comprenden sustancialmente todos 2'-desoxi adenosina, 2'-O-metil citidina, 2'-O-metil guanosina, y 2'-O-metil uridina. En una realización preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes comprenden una secuencia donde 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'-O-metil citidina, al menos el 80 % de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil guanosina, 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 donde 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'-O-metil citidina, al menos el 90% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil guanosina, y al menos el 90% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil uridina. En una realización lo más preferida, los oligonucleótidos modificados resultantes de la presente invención comprenden una secuencia donde el 100% de todos los nucleótidos de adenosina son 2'-desoxi adenosina, el 100% de todos los nucleótidos de citidina son 2'-O-metil citidina, el 100% de todos los nucleótidos de guanosina son 2'-O-metil guanosina, y el 100% de todos los nucleótidos de uridina son 2'-O-metil uridina.
- En cada caso, los productos de transcripción pueden usarse como la biblioteca en el proceso SELEX™ para identificar aptámeros y/o para determinar un motivo conservado de secuencias que tienen especificidad de unión para una diana dada. Las secuencias resultantes ya están estabilizadas, eliminando esta etapa del proceso para llegar a una secuencia de aptámero estabilizada y dando un aptámero mucho más estabilizado como resultado. Otra ventaja del proceso SELEX™ de 2'-OMe es que es probable que las secuencias resultantes necesiten menos nucleótidos de 2'-OH en su secuencia, posiblemente ninguno. Aunque permanezcan nucleótidos 2'-OH, pueden eliminarse efectuando modificaciones después de SELEX™.
- Como se describe más adelante, pueden obtenerse rendimientos menores aunque útiles de transcritos que incorporan por completo nucleótidos sustituidos en 2' en condiciones distintas de las condiciones optimizadas descritas anteriormente. Por ejemplo, las variaciones de las condiciones de transcripción incluyen:
- La concentración del tampón HEPES puede estar en el intervalo de 0 a 1 M. La presente invención también contempla el uso de otros agentes tamponadores que tienen un pKa entre 5 y 10 incluyendo, por ejemplo, tris(hidroximetil)aminometano,
- La concentración de DTT puede estar en el intervalo de 0 a 400 mM. Los métodos de la presente invención también proporcionan el uso de otros agentes reductores incluyendo, por ejemplo, mercaptoetanol.
- La concentración de espermidina y/o espermina puede estar en el intervalo de 0 a 20 mM.
- La concentración de PEG-8000 puede estar en el intervalo de 0 al 50 % (p/v). Los métodos de la presente invención también proporcionan el uso de otros polímeros hidrófilos incluyendo, por ejemplo, PEG de distinto peso molecular u otros polialquilenglicoles.
- La concentración de Triton X-100 puede estar en el intervalo de 0 al 0,1% (p/v). Los métodos de la presente invención también proporcionan el uso de otros detergentes no iónicos incluyendo, por ejemplo, otros detergentes, incluyendo otros detergentes de Triton-X.
- La concentración de MgCl<sub>2</sub> puede estar en el intervalo de 0,5 mM a 50 mM. La concentración de MnCl<sub>2</sub> puede estar en el intervalo de 0,15 mM a 15 mM. Tanto MgCl<sub>2</sub> como MnCl<sub>2</sub> tienen que estar presentes en los intervalos descritos, y en una realización preferida están presente en una relación de aproximadamente 10 a aproximadamente 3 de MgCl<sub>2</sub>:MnCl<sub>2</sub>, preferentemente, la relación es aproximadamente 3-5:1, más preferentemente, la relación es aproximadamente 3-4:1.
- La concentración de 2'-OMe NTP (de cada NTP) puede estar en el intervalo de 5 μM a 5 mM.
- La concentración de 2'-OH GTP puede estar en el intervalo de 0 μM a 300 μM. En algunas realizaciones, la transcripción sucede en ausencia de 2'-OH GTP (0 μM).
- La concentración de 2'-OH GMP, guanosina u otra 2'-OH G sustituida en una posición distinta de la posición 2' en el

azúcar, puede estar en el intervalo de 0 a 5 mM y donde, en algunas realizaciones, 2'-OH GTP no está incluida en la reacción, se necesita 2'-OH GMP y puede estar en el intervalo de 5 μM a 5 mM.

El molde de DNA puede estar en el intervalo de 5 nM a 5 mM.

La concentración de polimerasa mutante puede estar en el intervalo de 2 nM a 20 mM.

La pirofosfatasa inorgánica puede estar en el intervalo de 0 a 100 unidades/ml.

El pH puede estar en el intervalo de pH 6 a pH 9. Los métodos de la presente invención pueden realizarse dentro de un intervalo de pH de actividad de la mayor parte de las polimerasas que incorporan nucleótidos modificados.

La reacción de transcripción puede dejarse suceder desde aproximadamente una hora a semanas, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas.

Los aptámeros seleccionados que tienen la mayor afinidad y especificidad de unión según se demuestra por ensayos biológicos como se describen en los ejemplos más adelante son agentes terapéuticos adecuados para tratar afecciones en las que la proteína de complemento C5 está involucrada en la patogénesis.

## 20 QUÍMICA MEDICINAL DE APTÁMEROS

Una vez se han identificado los aptámeros que se unen a una diana deseada, pueden efectuarse de manera opcional varias técnicas para aumentar adicionalmente la unión y/o características funcionales de las secuencias de aptámero identificadas. Los aptámeros que se unen a una diana seleccionada identificada mediante el proceso SELEX™ (incluyendo SELEX™ modificado en 2') pueden truncarse opcionalmente para obtener la secuencia mínima de aptámero (también citada en el presente documento "construcción minimizada") que tiene las características de unión y/o funcionales deseadas. Un método para lograr esto es usando programas de plegado y análisis de secuencias (por ejemplo, alineando secuencias de clones resultantes de una selección para buscar motivos conservados y/o covariación) para informar el diseño de construcciones minimizadas. También pueden efectuarse experimentos de sondado bioquímico para determinar los extremos 5' y 3' de una secuencia de aptámero para informar el diseño de construcciones minimizadas. Las construcciones minimizadas pueden sintetizarse químicamente y probarse su unión y características funcionales en comparación con la secuencia no minimizada a partir de la cual se derivaron. Las variantes de una secuencia de aptámero que contienen una serie de eliminaciones 5', 3' y/o internas también pueden sintetizarse químicamente de manera directa y probarse para su unión y/o características funcionales en comparación con la secuencia de aptámero no minimizada a partir de la cual se derivan.

Adicionalmente, las reselecciones dopadas pueden usarse para explorar las necesidades de la secuencia dentro de una sola secuencia de aptámero activo (es decir, un aptámero que se une a una diana deseada identificada mediante el proceso SELEX™ (incluyendo SELEX™ modificado en 2'), o una sola secuencia de aptámero minimizada. Las reselecciones dopadas se efectúan usando un conjunto sintético degenerado que se ha diseñado basándose solo en la secuencia de interés. El nivel de degeneración normalmente varía del 70 % al 85 % del nucleótido de tipo silvestre, es decir, la secuencia de interés individual. Por lo general, las secuencias con mutaciones neutrales se identifican mediante el proceso de selección dopada, pero en algunos casos, los cambios de secuencia pueden dar como resultado mejoras en la afinidad. La información de secuencia compuesta a partir de clones identificados usando reselecciones dopadas puede usarse a continuación para identificar el motivo mínimo de unión y ayudar a los esfuerzos de optimización.

Las secuencias de aptámero identificadas usando el proceso SELEX™ (incluyendo SELEX modificado en 2' y reselecciones dopadas) y/o secuencias de aptámero minimizadas también pueden optimizarse de manera opcional después de SELEX™ usando química medicinal de aptámeros para efectuar mutagénesis al azar o dirigida de las secuencias para aumentar la afinidad de unión y/o características funcionales, o como alternativa para determinar qué posiciones en la secuencia son esenciales para la actividad de unión y/o características funcionales.

La química medicinal de aptámeros es una mejora en la técnica de aptámeros en la que conjuntos de variantes de aptámeros se sintetizan químicamente. Estos conjuntos de variantes difieren normalmente del aptámero parental mediante la introducción de un solo sustituyente, y difieren entre sí por la localización de este sustituyente. Estas variantes entonces se comparan entre sí y con la parental. Las mejoras en las características pueden ser suficientemente profundas como para que la inclusión de un solo sustituyente puede ser todo lo necesario para lograr un criterio terapéutico particular.

Como alternativa, la información obtenida a partir del conjunto de variantes sencillas puede usarse para diseñar conjuntos adicionales de variantes en las que se introduce más de un sustituyente de manera simultánea. En una estrategia de diseño, se clasifican todas las variantes de sustituyente individuales, se seleccionan las 4 mejores y todas las posibles combinaciones dobles (6), triples (4) y cuádruples (1) de estas 4 variantes de un solo sustituyente se sintetizan y ensayan. En una segunda estrategia de diseño, la mejor variante de un solo sustituyente se considera

como la nueva parental y todas las variantes de doble sustituyente que incluyen a esta variante de un solo sustituyente de mayor clasificación se sintetizan y ensayan. Pueden usarse otras estrategias, y estas estrategias pueden aplicarse de manera repetida, de tal modo que el número de sustituyentes se aumenta gradualmente mientras que se continúa identificando posibles variantes adicionales.

5 La química medicinal de aptámeros puede usarse en particular como un método para explorar la introducción local más que la global de sustituyentes. Debido a que los aptámeros se descubren dentro de bibliotecas que se generan mediante transcripción, cualquier sustituyente que se introduzca durante el proceso SELEX™ deben introducirse de manera global. Por ejemplo, si se desea introducir engarces de fosforotioato entre nucleótidos, estos solo pueden introducirse en cada A (o cada G, C, T, U etc.) (sustituidos globalmente). Los aptámeros que necesitan fosforotioatos en algunas A (o algunas G, C, T, U etc.) (sustituidas localmente) pero que no pueden tolerarlo en otras A no pueden descubrirse fácilmente mediante este proceso.

15 Los tipos de sustituyente que pueden utilizarse mediante el proceso de química médica de aptámeros están solo limitados por la capacidad para generarlos como reactivos de síntesis de fase sólida e introducirlos en un esquema de síntesis de oligómeros. El proceso no está limitado ciertamente solo a nucleótidos. Los esquemas de química médica de aptámeros pueden incluir sustituyentes que introducen voluminosidad estérica, hidrofobicidad, hidrofiliidad, lipofiliidad, lipofobicidad, carga positiva, carga negativa, carga neutra, zwitteriones, capacidad de polarización, resistencia a nucleasas, rigidez conformacional, flexibilidad conformacional, características de unión a proteínas, masa etc. Los esquemas de química médica de aptámeros pueden incluir modificaciones de bases, modificaciones de azúcares o modificaciones de engarce fosfodiéster.

20 Cuando se consideran los tipos de sustituyentes que es probable que sean beneficiosos dentro del contexto de un aptámero terapéutico, puede ser deseable introducir sustituciones que se encuentren dentro de una o más de las siguientes categorías:

- 25 (1) Sustituyentes ya presentes en el organismo, por ejemplo, 2'-desoxi, 2'-ribo, 2'-O-metil purinas o pirimidinas o 5-metil citosina.
- 30 (2) Sustituyentes que ya son parte de un agente terapéutico aprobado, por ejemplo, oligonucleótidos unidos a fosforotioato.
- (3) Sustituyentes que hidrolizan o degradan a una de las categorías anteriores, por ejemplo, oligonucleótidos unidos a metilfosfonato.

35 Los aptámeros de la presente invención incluyen aptámeros desarrollados mediante química medicinal de aptámeros como se describe en el presente documento.

40 La afinidad de unión a la diana de los aptámeros de la presente invención puede determinarse mediante una serie de reacciones de unión entre el aptámero y la diana (por ejemplo, una proteína) en el que una traza de aptámero marcado con <sup>32</sup>P se incubaba con diluciones en serie de la diana en un medio tamponado y después se analizan mediante filtración en nitrocelulosa usando un colector de filtración al vacío. Citado en el presente documento como el ensayo de unión por transferencia de puntos, este método usa un medio de filtración en tres capas que consiste (de arriba a abajo) en nitrocelulosa, fibra de nylon, y papel de transferencia de gel. El ARN que está unido a la diana se captura sobre el filtro de nitrocelulosa mientras que el ARN no unido a la diana se captura en el filtro de nylon. El papel de transferencia de gel se incluye como medio de soporte para otros filtros. Después de filtración, las capas de filtro se separan, secan y exponen a una pantalla de fósforo y se cuantifican usando un sistema de formación de imágenes fosforescentes a partir de este. Los resultados cuantificados pueden usarse para generar curvas de unión de aptámero a partir de las cuales pueden calcularse las constantes de disociación ( $K_d$ ). En una realización preferida, el medio tamponado usado para llevar a cabo las reacciones de unión es PBS de Dulbecco 1X (con Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>) más BSA 0,1 mg/ml.

50 En general, la capacidad de un aptámero para modular la actividad funcional de una diana, es decir, la actividad funcional del aptámero, puede determinarse usando modelos *in vitro* e *in vivo*, que variarán dependiendo de la función biológica de la diana. En algunas realizaciones, los aptámeros de la presente invención pueden inhibir una función biológica conocida de la diana, mientras que en otras realizaciones, los aptámeros de la invención pueden estimular una función biológica conocida de la diana. La actividad funcional de los aptámeros de la presente invención puede determinarse usando modelos *in vitro* e *in vivo* diseñados para medir una función conocida de una diana de componente de complemento.

60 Los aptámeros de la presente invención pueden adaptarse de manera rutinaria para fines diagnósticos de acuerdo con cualquier número de técnicas empleadas por aquellos expertos en la materia. La utilización diagnóstica puede incluir aplicaciones diagnósticas tanto *in vivo* como *in vitro*. Los agentes diagnósticos solo necesitan ser capaces de permitir al usuario identificar la presencia de una diana dada en una localización o concentración particular. Solo la capacidad para formar pares de unión con la diana puede ser suficiente para activar una señal positiva para fines diagnósticos. Los expertos en la materia también serán capaces de adaptar cualquier aptámero mediante procedimientos conocidos en la técnica para incorporar un marcador para detectar la presencia de dicho ligando. Dicho marcador puede usarse en un número de procedimientos diagnósticos.

MODULACIÓN DE FARMACOCINÉTICA Y BIODISTRIBUCIÓN DE AGENTES TERAPÉUTICOS DE APTÁMERO

Es importante que las propiedades farmacocinéticas para todos los agentes terapéuticos basados en oligonucleótidos, incluyendo aptámeros, se diseñen para armonizar con la aplicación farmacéutica deseada. Mientras que los aptámeros dirigidos contra dianas extracelulares no necesitan sufrir dificultades asociadas con el suministro intracelular (como es el caso de agentes terapéuticos antisentido y basados en ARNi), dichos aptámeros aún tienen que ser capaces de distribuirse a los órganos y tejidos diana, y de permanecer en el organismo (no modificados) durante un periodo de tiempo consistente con la pauta de dosificación deseada.

Por lo tanto, la presente invención proporciona materiales y métodos para afectar a la farmacocinética de composiciones de aptámeros, y, en particular, la capacidad para ajustar la farmacocinética del aptámero. La capacidad de ajuste (es decir, la capacidad para modular) la farmacocinética de aptámeros se logra mediante conjugación de restos modificantes (por ejemplo, polímeros de PEG) al aptámero y/o la incorporación de nucleótidos modificados (por ejemplo, 2'-fluoro o 2'-O-metilo) para alterar la composición química del ácido nucleico. La capacidad para ajustar la farmacocinética del aptámero se usa en la mejora de aplicaciones terapéuticas existentes, o como alternativa, en el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en un marco antineoplásico o de cuidados agudos donde puede desearse una eliminación o inactivación rápida, es deseable disminuir los tiempos de residencia de los aptámeros en la circulación. Como alternativa, en otras aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, terapias de mantenimiento donde se desea la circulación sistémica de un agente terapéutico, puede ser deseable aumentar los tiempos de residencia de los aptámeros en circulación.

Además, la capacidad de ajuste de la farmacocinética de un aptámero se usa para modificar la biodistribución de un agente terapéutico de aptámero en un sujeto. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable alterar la biodistribución de un agente terapéutico de aptámero en un esfuerzo por dirigirse a un tipo particular de tejido o un órgano específico (o conjunto de órganos). En estas aplicaciones, el agente terapéutico de aptámero se acumula preferentemente en un tejido u órgano (u órganos) específico. En otras aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable dirigirse a tejidos que muestran un marcador celular o un síntoma asociado con una enfermedad dada, lesión celular u otra patología anormal, de tal modo que el agente terapéutico de aptámero se acumula preferentemente en el tejido afectado. Por ejemplo, como se describe en la solicitud provisional de los Estados Unidos con número de Serie 60/550790 (US 2006/0030535), registrada el 5 de marzo de 2004, y titulada "Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics", y en la solicitud no provisional de los Estados Unidos con número de Serie 11/075.648 (US 2006/0030535), registrada el 7 de marzo de 2005, 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 dirigirse a tejidos inflamados, de tal modo que el agente terapéutico de aptámero PEGilado se acumula preferentemente en tejido inflamado.

Para determinar los perfiles farmacocinéticos y de biodistribución de agentes terapéuticos de aptámero (por ejemplo, conjugados de aptámero o aptámeros que tienen químicas alteradas, tales como nucleótidos modificados) se controlan varios parámetros. Dichos parámetros incluyen, por ejemplo, la semivida ( $t_{1/2}$ ), la eliminación en plasma (Cl), el volumen de distribución ( $V_{ss}$ ), el área bajo la curva de concentración-tiempo (ABC), concentración máxima en suero o plasma observada ( $C_{m\acute{a}x}$ ), y el tiempo medio de residencia (TMR) 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 de ABC se usa para estimar la biodisponibilidad (es decir, el porcentaje de agente terapéutico de aptámero administrado en circulación después de la administración del aptámero) y/l la 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 relaciona con la concentración en plasma de un agente terapéutico de aptámero a la cantidad de aptámero presente en el organismo. Cuando mayor sea el  $V_{ss}$ , más se encontrará un aptámero fuera del plasma (es decir, mayor extravasación).

La presente invención proporciona materiales y métodos para modular, de manera controlada, la farmacocinética y la biodistribución de composiciones estabilizadas de aptámero *in vivo* conjugando un aptámero a 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 este documento, la conjugación de un resto modificante y/o la alteración de la composición química del nucleótido (o los nucleótidos) altera aspectos fundamentales del tiempo de residencia del aptámero en la circulación y la distribución a los tejidos.

Además de la eliminación mediante nucleasas, los agentes terapéuticos de oligonucleótidos están sujetos a eliminación mediante filtración renal. Como tal, un oligonucleótido resistente a nucleasas administrado por vía intravenosa exhibe una semivida *in vivo* de <10 min, a menos que pueda bloquearse la filtración. Esto puede lograrse facilitando una rápida distribución fuera del torrente sanguíneo hacia tejidos o aumentando el peso molecular aparente del oligonucleótido por encima del valor efectivo de corte por tamaño de los glomérulos. La conjugación de agentes terapéuticos pequeños a un polímero de PEG (PEGilación), descrita más adelante, puede

alargar de manera dramática los tiempos de residencia de los aptámeros en la circulación, por tanto disminuyendo la frecuencia de dosificación y potenciando la efectividad contra dianas vasculares.

5 Además, también puede modularse la filtración de aptámeros desde el tejido ocular, en particular bloquearse, aumentando el peso molecular aparente del aptámero de la invención, tal como mediante conjugación a un polímero de PEG.

10 Los aptámeros pueden conjugarse a varios restos modificantes, tales como polímeros de elevado peso molecular, por ejemplo, PEG; péptidos, por ejemplo, Tat (un fragmento de 13 aminoácidos de la proteína Tat de VIH (Vives, et al., (1997), J. Biol. Chem. 272(25): 16010-7)), Ant (una secuencia de 16 aminoácidos derivada de la tercera hélice de la proteína homeótica de *Drosophila antennapedia* (Pietersz, et al., (2001), Vaccine 19(11-12): 1397-405)) y Arg<sub>7</sub> (un péptido corto cargado positivamente permeable a células compuesto de poliarginina (Arg<sub>7</sub>) (Rothbard, et al., (2000), Nat. Med. 6(11): 1253-7; Rothbard, J et al. (2002), J. Med. Chem. 45(17): 3612-8)); y moléculas pequeñas, por ejemplo, compuestos lipófilos, tales como colesterol. De entre los varios conjugados descritos en el presente documento, las propiedades *in vivo* de los aptámeros se alteran más profundamente mediante conjugación con grupos PEG. Por ejemplo, descritos en la solicitud no provisional citada anteriormente (número de serie de los Estados Unidos 11/075.648 registrada el 7 de marzo de 2005, y titulada "Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics"), conjugación de un agente terapéutico de aptámero con un polímero de PEG de 20 kDa impide la filtración renal y promueve la distribución del aptámero a tejidos tanto sanos como inflamados. Además, el conjugado de polímero de PEG de 20 kDa-aptámero se ha mostrado prácticamente tan efectivo como un polímero de PEG de 40 kDa para prevenir la filtración renal de aptámeros. Mientras que un efecto de la PEGilación es sobre la eliminación de aptámero, la exposición sistémica prolongada producida por la presencia del resto de 20 kDa facilita la distribución de aptámero a tejidos, en particular aquellos de órganos elevadamente perfusionado y aquellos en el sitio de inflamación. El conjugado aptámero-polímero de PEG de 20 kDa dirige la distribución del aptámero al sitio de inflamación, de tal modo que el aptámero PEGilado se acumula preferentemente en tejido inflamado. En algunos casos, el conjugado de aptámero PEGilado de 20 kDa es capaz de acceder al interior de células, tales como, por ejemplo, células renales.

30 En general, los efectos de la farmacocinética del aptámero y distribución en tejidos producidos por restos modificantes de bajo peso molecular, incluyendo colesterol y péptidos permeabilizantes a células son normalmente menos pronunciados que aquellos producidos como resultado de la PEGilación o modificación de nucleótidos (por ejemplo, una composición química alterada). Aunque no se pretende estar unidos a teoría alguna, se sugiere que las asociaciones mediadas por colesterol con lipoproteínas de plasma, que se postula que suceden 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 o naturaleza lipófila del grupo colesterol. Al igual que el colesterol, la presencia de un marcador de péptido Tat promueve la eliminación del aptámero del torrente sanguíneo, con niveles comparativamente altos de conjugado apareciendo en los riñones a las 48 horas. Otros péptidos (por ejemplo, Ant, Arg<sub>7</sub>) que se ha comunicado en la técnica que median el paso de macromoléculas a través de las membranas celulares *in vitro*, no parecen promover la eliminación de aptámero de la circulación. Sin embargo, al igual que Tat, el conjugado Ant se acumula significativamente en los riñones en relación a otros aptámeros. Aunque no se pretende estar unidos a teoría alguna, es posible que la presentación desfavorable de los restos modificantes de péptido Ant y Arg<sub>7</sub> en el contexto de aptámeros plegados tridimensionalmente *in vivo* deteriore la capacidad de estos péptidos para influenciar las propiedades de transporte del aptámero.

45 Los oligonucleótidos modificados también pueden usarse para modular la eliminación de los aptámeros del plasma. Por ejemplo, un aptámero no conjugado que incorpora, por ejemplo, 2'-fluoro, 2-OMe y/o químicas estabilizantes de fosforotioato, que es típico de los aptámeros de la generación actual ya que exhibe un elevado grado de estabilidad a nucleasas *in vitro* e *in vivo*, muestra una rápida pérdida desde el plasma (es decir, eliminación rápida del plasma) y una distribución rápida dentro de los tejidos, principalmente dentro del riñón, cuando se compara con aptámero no modificado.

#### Ácidos nucleicos derivatizados mediante PAG

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

60 Las composiciones de aptámero de la invención pueden derivatizarse con restos de polialquilenglicol ("PAG"). Los ejemplos de ácidos nucleicos derivatizados con PAG se encuentran en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con N° de Serie 10/718.833 (US 2004/0180360), presentada el 21 de noviembre de 2003. Los polímeros típicos usados en la invención incluyen poli(etilenglicol) ("PEG"), también conocido como poli(óxido de etileno) ("PEO) y polipropilenglicol (incluyendo poli isopropilenglicol). Adicionalmente, pueden usarse copolímeros al azar o de bloque de diferentes óxidos de alquileo (por ejemplo, óxido de etileno y óxido de propileno) en muchas aplicaciones. En su forma más común, un polialquilenglicol, tal como PEG, es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos

hidroxilo: HO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH. Este polímero, alfa-, omega-dihidroxipoli(etilenglicol), también puede representarse como HO-PEG-OH, donde se entiende que el símbolo -PEG- representa la siguiente unidad estructural: -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- donde n está normalmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10.000.

Los polímeros de PAG adecuados para indicaciones terapéuticas tienen las propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos, ausencia de toxicidad, y ausencia de inmunogenicidad. Un uso de los PAG es unir al polímero a moléculas insolubles para hacer que el "conjugado" PAG-molécula resultante sea soluble. Por ejemplo, se ha demostrado que el fármaco insoluble en agua paclitaxel, cuando se acopla a PEG, se hace soluble en agua, Greenwald, et al., J. Org. Chem., 60:331-336 (1995). Los conjugados de PAG se usan a menudo no solo para potenciar la solubilidad y estabilidad sino también para prolongar la semivida de circulación en sangre de moléculas. La capacidad de derivatización de PAG, por ejemplo, conjugación con PEG, para alterar la biodistribución de un agente terapéutico se relaciona con un número de factores, incluyendo tamaño aparente (por ejemplo, medido en términos de radio hidrodinámico) del conjugado. Se sabe que los conjugados mayores (>10 kDa) bloquean de manera más eficiente la filtración a través del riñón y por consiguiente aumentan la semivida en suero de macromoléculas pequeñas (por ejemplo, péptidos, oligonucleótidos antisentido). Se ha demostrado que la capacidad de los conjugados de PEG para bloquear la filtración aumenta con el aumento de tamaño de PEG hasta aproximadamente 50 kDa (los aumentos adicionales tienen un efecto beneficioso mínimo ya que la semivida queda definida por el metabolismo mediado por macrófagos en vez de la eliminación a través de los riñones).

Los compuestos derivatizados con PAG de la invención tienen un tamaño normalmente entre 5 y 80 kDa, aunque puede usarse cualquier tamaño, dependiendo la elección del aptámero y de la aplicación. Otros compuestos derivatizados con PAG de la invención tienen un tamaño de entre 10 y 80 kDa. Otros compuestos más derivatizados con PAG de la invención tienen un tamaño de entre 10 y 60 kDa. En algunas realizaciones, Los restos de PAG derivatizados a composiciones de la presente invención son PEG en el intervalo de 10, 20, 30, 40, 50, 60, u 80 kDa de tamaño. En algunas realizaciones, el PEG es PEG lineal, mientras que en otras realizaciones, el PEG es PEG ramificado. En otras realizaciones más, el PEG es un PEG ramificado de 40 kDa como se ilustra en la Figura 4. En algunas realizaciones, el PEG ramificado de 40 kDa está unido al extremo 5' del aptámero, como se ilustra en la Figura 5.

La presente invención proporciona una vía efectiva en cuanto al coste para la síntesis de conjugados PEG de elevado peso molecular-ácido nucleico (preferentemente, aptámero) incluyendo múltiples ácidos nucleicos PEGilados. La presente invención también abarca oligonucleótidos multiméricos unidos a PEG, por ejemplo, aptámeros dimerizados. A diferencia de agentes terapéuticos de proteínas expresados biológicamente, los agentes terapéuticos de aptámero se sintetizan químicamente de manera típica a partir de monómeros de nucleótidos activados. Los conjugados PEG-ácido nucleico pueden prepararse mediante la incorporación del PEG usando la misma síntesis iterativa de monómero. Por ejemplo, Los PEG activados mediante conversión a forma de fosforamidita pueden incorporarse a síntesis de oligonucleótidos de fase sólida. Como alternativa, la síntesis de oligonucleótidos puede completarse con incorporación específica de sitio de un sitio de unión a PEG reactivo.

#### PEG ACTIVADO

La producción de PEG de elevado peso molecular (> 10 kDa) puede ser difícil, ineficiente, y cara. Como vía hacia la síntesis de conjugados de PEG de elevado peso molecular-ácido nucleico, el trabajo anterior se centró en la generación de PEG activados de mayor peso molecular. El método para generar dichas moléculas incluye la formación de un PEG activado lineal, o un PEG activado ramificado, en cuyo caso se unen dos o más PEG a un núcleo central que porta al grupo activado. Las porciones terminales de estas moléculas de PEG de elevado peso molecular, es decir, los restos de hidroxilo (-OH) relativamente no reactivos, pueden activarse, o convertirse a restos funcionales, para la unión de uno o más de los PEG a otros compuestos como sitios reactivos del compuesto. Los PEG activados ramificados tendrán más de dos términos, y en los casos donde se han activado más de dos o más términos, dichas moléculas de PEG de elevado peso molecular activadas se citan en el presente documento como PEG multiactivados. En algunos casos, no se activan todos los términos en una molécula de PEG ramificada. En los casos donde cualquiera de los dos términos de una molécula de PEG ramificada estén activados, dichas moléculas de PEG se citan como PEG biactivados. En algunos casos donde solo está activado un término en una molécula de PEG ramificado, dichas moléculas de PEG se citan como PEG monoactivados. Como ejemplos de esta estrategia, se han descrito PEG activados preparados mediante la unión de dos PEG monometoxi a un núcleo de lisina que a continuación se activan para reacción (Harris et al., Nature, vol. 2: 214-221, 2003).

Como se muestra en la Figura 6, la molécula lineal de PEG es difuncional y en ocasiones se cita como "PEG diol". Las porciones terminales de la molécula de PEG son restos hidroxilo relativamente no reactivos, los grupos -OH, que pueden activarse, o convertirse a restos funcionales, para la unión del PEG a otros compuestos en sitios reactivos del compuesto. Dichos PEG dioles activados se citan en el presente documento como PEG biactivados. Por ejemplo, los restos terminales de PEG diol se han funcionalizado como éster de carbonato activo para reacción selectiva con restos amino mediante sustitución de los restos hidroxilo relativamente no reactivos, -OH, con restos de éster activo de succinimidilo a partir de N-hidroxi succinimida. Como alternativa, los PEG dioles pueden activarse con varios grupos, incluyendo, sin limitación, ácidos  $\alpha$ -halo acéticos, epihalohidruros, maleatos, tartratos y



carbohidratos que después de una manipulación adecuada producirían carbonilo activado o equivalentes para conjugación. Otros métodos para activar PEG se describen en Roberts et al., (2002) *Advanced Drug Deliver Reviews* 54:549-476. Además de activar PEG usando uno de los métodos anteriormente descritos, una o ambas de las funcionalidades del alcohol terminal de la molécula de PEG pueden modificarse para permitir diferentes tipos de conjugación a un ácido nucleico. Por ejemplo, convertir una de las funcionalidades del alcohol terminal a una amina, o a un tiol, permite el acceso a conjugados de urea y tiouretano.

En muchas aplicaciones, es deseable cubrir la molécula de PEG en un extremo con un resto esencialmente no reactivo de tal modo que la molécula de PEG es mono funcional (o monoactivada). En el caso de agentes terapéuticos de proteína que generalmente muestran múltiples sitios de reacción para PEG activados, los PEG activados bifuncionales conducen a una reticulación extensiva, produciendo agregados poco funcionales. Para generar PEG monoactivados, se sustituye normalmente un resto hidroxilo en el término de la molécula de PEG diol con un resto terminal metoxi no reactivo,  $-OCH_3$ . El otro término no reactivo de la molécula de PEG se convierte normalmente a un resto terminal reactivo que puede activarse para la unión a un sitio reactivo sobre una superficie o una molécula, tal como una proteína.

#### APTÁMEROS CONJUGADOS A UNO O MÁS PEG

De manera más común, la síntesis de conjugados PAG de elevado peso molecular-ácido nucleico se ha efectuado mediante adición de una amina libre primaria en el extremo 5' (incorporado usando un modificador de fosoramidita en la última etapa de acoplamiento de síntesis de fase sólida). Utilizando esta estrategia, un PEG reactivo (por ejemplo, uno que está activado de tal modo que reaccionará y formará un enlace con una amina) se combina con el oligonucleótido purificado y la reacción de acoplamiento se llevará a cabo en solución.

Además, los conjugados PAG de elevado peso molecular-ácido nucleico-PAG pueden prepararse mediante reacción de un PEG activado monofuncional con un ácido nucleico que contiene más de un sitio reactivo. En una realización, el ácido nucleico es birreactivo, y contiene dos sitios reactivos: un grupo 5'-amino y un grupo 3'-amino introducido en el oligonucleótido mediante síntesis de fosoramidita convencional y comenzando con un soporte sólido de 3'-amina, por ejemplo: la 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 aminas primarias. En dichas realizaciones, el ácido nucleico puede tener varios sitios activados o reactivos y se dice que están activados de manera múltiple.

Para producir un conjugado ácido-PEG-ácido nucleico, el ácido nucleico se sintetiza originalmente de tal modo que porta un solo sitio reactivo (por ejemplo, está monoactivado). En una realización preferida, este sitio reactivo es un grupo amino introducido en el extremo 5' mediante adición de un modificador de fosoramidita como última etapa en la síntesis de fase sólida del oligonucleótido. En otra realización preferida, la síntesis se efectúa usando un modificador de 3'-amina, e introduciendo una amina en el extremo 5', lo que conduce a un 3',5'-diamina oligonucleótido. Después de la desprotección y purificación del oligonucleótido modificado, se reconstituye a alta concentración en una solución que minimiza la hidrólisis espontánea del PEG activado. En una realización preferida, la concentración de oligonucleótido es 1 mM y la solución reconstituida contiene 200 mM de tampón de  $NaHCO_3$ , pH 8,3. La síntesis del conjugado se inicia mediante la adición lenta paso a paso de PEG activado elevadamente purificado. En una realización preferida, el PEG se activa como carbonato de p-nitrofenilo. Después de la reacción, el conjugado PEG-ácido nucleico se purifica mediante electroforesis en gel o cromatografía líquida para separar especies completamente, parcialmente, y no conjugadas.

#### MÚLTIPLES APTÁMEROS CONJUGADOS A UN PEG

La presente invención también abarca composiciones de aptámero de elevado peso molecular en las que dos o más restos de ácidos nucleicos están conjugados covalentemente a al menos un resto de polialquilenglicol. Los restos de polialquilenglicol sirven como restos estabilizantes. Un resto estabilizante es una molécula, o porción de una molécula, que mejora las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de las composiciones de aptámero de elevado peso molecular de la invención. En algunos casos, un resto estabilizante es una molécula o porción de una molécula que acerca dos o más aptámeros, o dominios de aptámeros, en proximidad, o proporciona una libertad rotacional general disminuida de las composiciones de aptámero de elevado peso molecular de la invención. 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 modificados, y/o enlaces modificados, tales como fosforotioatos.

Un resto estabilizante puede ser parte integral de una composición de aptámero, es decir, está unido covalentemente al aptámero. En las composiciones donde un polialquilenglicol está unido covalentemente a cualquier extremo de un aptámero, de tal forma que el polialquilenglicol junta los restos de ácido nucleico en una molécula, se dice que el polialquilenglicol es un resto enlazante. En dichas composiciones, la estructura primaria de la molécula covalente incluye la disposición lineal ácido nucleico-PAG-ácido nucleico. Un ejemplo de una composición donde un resto estabilizante de PEG sirve como enlazante que separa diferentes porciones de un

aptámero es una composición donde PEG se conjuga dentro de una sola secuencia de aptámero, de tal forma que la disposición lineal de la composición de aptámero de elevado peso molecular es, por ejemplo, ácido nucleico - PEG - ácido nucleico (PEG -ácido nucleico)<sub>n</sub> donde n es mayor que o igual a 1.

5 Para producir un conjugado ácido-PEG-ácido nucleico, el ácido nucleico se sintetiza originalmente de tal modo que porta un solo sitio reactivo (por ejemplo, está monoactivado). En una realización preferida, este sitio reactivo es un grupo amino introducido en el extremo 5' mediante adición de un modificador de fosforamida como última etapa en la síntesis de fase sólida del oligonucleótido. Después de la desprotección y purificación del oligonucleótido modificado, se reconstituye a alta concentración en una solución que minimiza la hidrólisis espontánea del PEG  
10 activado. En una realización preferida, la concentración de oligonucleótido es 1 mM y la solución reconstituida contiene 200 mM de tampón de NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3. La síntesis del conjugado se inicia mediante la adición lenta paso a paso de PEG bifuncional elevadamente purificado. En una realización preferida, el PEG diol se activa en ambos extremos (biactivado) mediante derivatización como carbonato de p-nitrofenilo. Después de la reacción, el conjugado PEG-ácido nucleico se purifica mediante electroforesis en gel o cromatografía líquida para separar especies completamente, parcialmente, y no conjugadas. Pueden unirse múltiples moléculas de PAG concatenadas (por ejemplo, como copolímeros al azar o de bloque) o cadenas más pequeñas de PAG para lograr varios longitudes (o pesos moleculares). Los enlazantes no de PAG pueden usarse entre cadenas de PAG de diversas longitudes.

20 Los dominios enlazantes también pueden tener uno o más restos de polialquilenglicoles unidos a estos. Dichos PAG pueden ser de varias longitudes y pueden usarse en combinaciones adecuadas para lograr el peso molecular de la composición deseado.

25 El efecto de un enlazante concreto puede influenciarse tanto por su composición química como su longitud. Un enlazante que sea demasiado largo, demasiado corto, o que forme interacciones estéricas y/o iónicas desfavorables con el componente diana de complemento impedirá la formación de complejo entre el aptámero y el componente diana de complemento. Un enlazante, que es más largo de lo necesario para abarcar la distancia entre ácidos nucleicos, puede reducir la estabilidad de unión disminuyendo la concentración efectiva del ligando. Por tanto, a menudo es necesario optimizar las composiciones de enlazante y las longitudes para maximizar la afinidad de un aptámero por una diana.

30

#### Aptámeros con afinidad de unión a una proteína C5 del sistema de complemento

35 En algunas realizaciones de la presente invención, se describen aptámeros que son capaces de unirse específicamente y modular a la proteína de complemento C5. Estos aptámeros proporcionan una modalidad de baja toxicidad, segura y efectiva para tratar, mejorar y/o prevenir varias enfermedades o trastornos relacionados con complemento incluyendo DMAE de tipo no exudativo. Estos aptámeros también pueden usarse en diagnósticos.

40 En algunas realizaciones, los aptámeros de la presente invención pueden usarse como un modo de baja toxicidad, seguro y efectivo para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo ("seca"). Estos aptámeros también pueden usarse en diagnósticos oculares.

45 Se proporciona un aptámero aislado de origen no natural que se une a la proteína de complemento C5. Se proporciona un aptámero aislado de origen no natural que se une a la proteína de complemento C5 para su uso en los métodos de la invención para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo. El aptámero aislado de origen no natural puede tener una constante de disociación ("K<sub>d</sub>") para la proteína de complemento C5 de menos de 100 μM, menos de 1 μM, 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. La constante de disociación puede determinarse mediante titulación de transferencia puntual como se describe en el Ejemplo 1 más adelante.

50 El aptámero para su uso en los métodos de la invención modula una función de la proteína de complemento C5, en particular, inhibe una función de la proteína de complemento C5 y/o la función de una variante de la proteína de complemento C5. Una variante de la proteína de complemento C5, tal como se usa en el presente documento, abarca variantes que efectúan esencialmente la misma función que la función de la proteína de complemento C5. Una variante de la proteína de complemento C5 comprende preferentemente sustancialmente la misma estructura y en algunas realizaciones comprende al menos un 80% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 90% de identidad de secuencia, y más preferentemente al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la proteína de complemento C5 que comprende la secuencia de aminoácidos a continuación (SEC ID N°: 102) (citada en Haviland et al., J Immunol. 1 de enero de 1991;146(1):362-8):

55

```

1  mglilgilcfl iflgktwgqe qtyvisapki frvgaseniv iqvygyteaf datisiksyp
61  dkkfsyssgh vhlssenkfq nsailtiqpk qlpgggqnpvs yvylevvskh fskskrmpit
121 ydngflfiht dkpvytpdqs vkvrsvslnd dlkpakretv ltfidpegse vdmveeidhi
181 giisfpdfki psnprygmwt ikakykedfs ttgtayfevk eyvlphfsvs iepaynfigy
241 knfknfeiti karyfynkvv teadvyitfg iredlkddqk emmqtamqnt mlingiaqvt
301 fdsetavkel syysledlnn kylyiavtvi estggfseea eipgikyvls pyklnlvatp
361 lflkpgipyp ikvqvksld qlvggvpvtl naqtidvnqe tsdldpsksv trvddgvasf
421 vlnlpsgvtv lefnvktdap dlpeengare gyraiayssl sqsylyidwt dnhkallvge
481 hlniivtpks pyidkithyn ylilskgkii hfgtrekfsd asyqsinipv tqnmvpsrsl
541 lvyvvtgeq taelvsdsvw lniececgnq lqvhlspdad ayspgqtvsl nmatgmdswv
601 alaavdsavy gvqrgakkpl ervfqfleks dlqcgagggl nnanvfhlag lftltnanad
661 dsqendepck eilrprrtlq kkieeiaaky khsvvkkccy dgacvndet ceqraarisl
721 gprcikaftc ccvvasqlra nishkdmqlg rlmkltllpv skpeirsyfp eswlwevhlv
781 prrkqlqfal pdslttweig gvgisntgic vadtvkakvf kvdflemnlp ysvvrgeqiq
841 lkgtvynyrnt sgmqfcvkms avegictses pvidhggtsk skcvrqrkveg ssshlvtftv
901 lpleiglhnf nfsletwfgk eilvktlrsv pegvkresys gvtldprgiy gtisrrkfp
961 yripldlvpk teikrilsvk gllvgeilsa vlsqeginil thlpkgsaea elmsvvpvfy
1021 vfhyletgnh wnifhsdpli ekqklkkklk egmlsimsyr nadysysvkw ggsastwlta
1081 falrvlgqvn kyvegnqnsi cnsllwlven yqldngsfke nsqyqpiklq gtlpvearen

```

```

1141 slyltaftvi girkafdicp lvkidtalik adnfilentl pagstftlai sayalslgdk
1201 thpqfrsivs alkrealvkg nppiyrfwkd nlqhkdsstp ntgtarmvet tayalltsln
1261 lkdiyvnvpv ikwlseeqry gggfystqdt inaiegltey allvkqlrls mdidvsvykhk
1321 galhnykmta knflgrpvev llnddlivst gfgsglatvh vttvvhktst seevcsfylk
1381 idtqdieash yrqygnsdyk rivacasykp sreesssgss havmdislpt gisaneedlk
1441 alvegvdqfl tdyqikdghv ilqlnsipss dflcvrfrif elfevgflsp atftvyeyhr
1501 ydkqctmfys tsnikiqkvc egaackcvea dcggmqeeld ltisaetrkq tackpeiaya
1561 ykveitsitv envfvkykat lldiyktgea vaekdseitf ikkvctctnae lvkgrqylim
1621 gkealqikyn fsfryiypld sltwieywpr dttcsscqaf lanldefaed iflngc

```

5 En algunas realizaciones de la invención, la identidad de secuencia de variantes diana se determina usando BLAST como se describe a continuación. Los términos "identidad de secuencia" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o proteínas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean para una máxima correspondencia, según se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Para la comparación de secuencias, una secuencia actúa normalmente como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan en caso necesario las coordenadas de secuencia, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula a continuación el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia (o secuencias) de prueba en relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados. La alineación óptima de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, *J Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (véase de manera general, Ausubel et al., más adelante).

25 Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el tanto por ciento de identidad de secuencia es el algoritmo usado en la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (en lo sucesivo "BLAST"), véase, por ejemplo, Altschul et al., *J Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990) y Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 15: 3389-3402 (1997). El programa informático para efectuar análisis de BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (en lo sucesivo "NCBI"). Los parámetros por defecto usados para determinar la identidad de secuencia usando el programa disponible a través del NCBI, por ejemplo, BLASTN (para secuencias de nucleótidos) y BLASTP (para secuencias de aminoácidos) se describen en McGinnis et al., *Nucleic Acids Res.* 32: W20-W25 (2004).

35 Los aptámeros anti-C5 de la divulgación incluyen una mezcla de nucleótidos modificados con 2'-fluoro, nucleótidos modificados con 2'-OMe ("2'-OMe") y restos de purina 2'-OH. Una secuencia genérica descriptiva (SEC ID N°: 1) para un aptámero anti-C5 modificado se muestra más adelante en la Tabla 1, y la estructura se muestra en la Figura 3A. La gran mayoría de purinas (A y G) se han modificado a 2'-OMe, excluyendo solo dos restos de G que permanecen como 2'-OH (restos mostrados en contorno). Los restos marcados con un círculo representan un

subconjunto de pirimidinas que pueden modificarse de manera simultánea a 2'-H sin alterar de manera sustancial la actividad anti-C5 del aptámero (véase ARC33' en la Tabla 1 más adelante (SEC ID N°: 2, Figura 3B). Los restos subrayados mostrados en la Figura 3A representan restos de pirimidina que pueden contener o bien una modificación 2'-fluoro o 2'-H (pero no 2'-OMe), mientras que los restos marcados con un recuadro representan restos de pirimidina que pueden contener una modificación 2'-fluoro o 2'-OMe (pero no 2'-H). Los restos indicados con una flecha (→) tienen que contener una modificación 2'-fluoro. Sin una modificación 2'-fluoro en los restos indicados con una flecha (→), la actividad hemolítica resultante del aptámero resultante se disminuye de manera sustancial.

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

Se describen en la Tabla 1 a continuación otras combinaciones de aptámeros que contienen una mezcla de modificaciones 2'-fluoro, modificaciones 2'-OMe, restos de 2'-OH purina y conjugación a compuestos no inmunogénicos de elevado peso molecular (por ejemplo, PEG) de distintos tamaños, cada uno de los cuales se derivaron de ARC186 (SEC ID N°: 4). La divulgación también comprende aptámeros como se describen más adelante pero que carecen del tapón 3' (por ejemplo, tapón de desoxitimidina invertida) y/o aptámeros indicados más adelante pero que comprenden un tapón 3' (por ejemplo, dT invertida) donde no se indica un tapón 3'.

A menos que se indique otra cosa, las secuencias de nucleótidos en la Tabla 1 más adelante se listan en la dirección 5' a 3'. Para cada una de las secuencias individuales en la Tabla 1, todas las modificaciones 2'-OMe de purina o pirimidina se indican mediante una "m" precediendo al nucleótido correspondiente; todas las modificaciones 2'-fluoro de pirimidina se indican mediante una "f" precediendo al nucleótido correspondiente; todas las modificaciones desoxi de purina o pirimidina se indican mediante una "d" precediendo al nucleótido correspondiente; y cualquier purina o pirimidina que aparezca son una "m", una "f", o una "d" precediendo al nucleótido indica un resto 2'-OH. Además, un "3T" indica una desoxitimidina invertida, "NH" indica un enlazante de hexilamina, "NH<sub>2</sub>" indica un grupo terminal de hexilamina, "PEG" indica un grupo polietilenglicol que tiene el peso molecular indicado, y "biotin" indica un aptámero que tiene biotina conjugada al extremo 5'.

Tabla 1:

SEC ID N°: 1

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>fCfCrGfCX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>fUX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>rGX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>X<sub>23</sub>fUX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>fCX<sub>29</sub>

donde:

X<sub>1</sub>=fC o mC  
 X<sub>2</sub>=rG o gy  
 X<sub>3</sub>=rG o mG  
 X<sub>4</sub>=rG o mG  
 X<sub>5</sub>=fC o dC  
 X<sub>6</sub>=fU o dT  
 X<sub>7</sub>=fC o dC  
 X<sub>8</sub>=rA o mA  
 X<sub>9</sub>=rG o mG  
 X<sub>10</sub>=rG o mG  
 X<sub>11</sub>=fC o dC  
 X<sub>12</sub>=fC o mC  
 X<sub>13</sub>=fU o mU  
 X<sub>14</sub>=rG o mG  
 X<sub>15</sub>=rA o mA  
 X<sub>16</sub>=rG o mG  
 X<sub>17</sub>=fU o dT  
 X<sub>18</sub>=fC o dC  
 X<sub>19</sub>=fU o dT  
 X<sub>20</sub>=rG o mG  
 X<sub>21</sub>=rA o mA  
 X<sub>22</sub>=rG o mG  
 X<sub>23</sub>=fU o dT  
 X<sub>24</sub>=rA o mA  
 X<sub>25</sub>=fC o dC



fCmGACfCGACmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGdCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC419 (SEC ID N°: 23)  
5 fCmGACfCGACmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGACTmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAACfUmGACmG  
ARC420 (SEC ID N°: 24)  
fCmGACfCGACmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGdCTmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCACfUmGACmG  
ARC421 (SEC ID N°: 25)  
10 fCmGACfCGACmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGTfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC422 (SEC ID N°: 26)  
fCmGACfCGACmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC423 (SEC ID N°: 27)  
15 fCmGACfCGACmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC424 (SEC ID N°: 28)  
20 fCmGACfCGACmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGACfUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTAfCfCfUmGfCmG  
ARC425 (SEC ID N°: 29)  
fCmGACfCGACmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC426 (SEC ID N°: 30)  
25 fCmGACfCGACmGmGmUdCTdCmAmGmGdCGACfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAdCdCfUmGfCmG  
ARC427 (SEC ID N°: 31)  
fCmGACmCGACmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGACfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC428 (SEC ID N°: 32)  
30 fCmGfCfCGmCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC429 (SEC ID N°: 33)  
35 fCmGfCmCGmCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC430 (SEC ID N°: 34)  
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGmCfUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC431 (SEC ID N°: 35)  
40 fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGfCmUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm  
ARC432 (SEC ID N°: 36)  
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC433 (SEC ID N°: 37)  
45 fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGmUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC434 (SEC ID N°: 38)  
50 fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUmUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC435 (SEC ID N°: 39)  
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUmUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC436 (SEC ID N°: 40)  
55 fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGmUmUmUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC437 (SEC ID N°: 41)  
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCfmGmAmGfUfUfUAfCfCmUmGfCmG  
ARC438 (SEC ID N°: 42)  
60 fCmGfCfCdGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC439 (SEC ID N°: 43)  
65 fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCdGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG  
ARC440 (SEC ID N°: 44)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUdAfCfCfUmGfCmG

ARC457 (SEC ID N°: 45)

mGfCmGfUfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmAfCmGmC

5

ARC458 (SEC ID N°: 46)

mGmGmGfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmCmCmC

ARC459 (SEC ID N°: 47)

mGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGmC

10

ARC473 (SEC ID N°: 48)

mGmGmAfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGfUfCfU-3T

15

ARC522 (SEC ID N°: 49)

mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTfUfUAdCdCTmGfCmGmCmC

ARC523 (SEC ID N°: 50)

mGmGmCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTAdCdCTmGdCmGmCmC

20

ARC524 (SEC ID N°: 51)

mGmGmCmGdCdCGdCmGmGTdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTmAdCdCTmGdCmGmCmC

ARC525 (SEC ID N°: 52)

mGmGmCmGdCdCGdCmGmGTdCmUmCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGmUmCmUmGmAmGTTTmAdCdCmGdCmGmCmC

25

ARC532 (SEC ID N°: 53)

Biotina-AGfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfUfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

30

ARC543 (SEC ID N°: 54)

mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGmCmC

ARC544 (SEC ID N°: 55)

mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUmCmUmCmAmGmGmCGfCfUmGmAmGmUmCmUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGmCmC

35

ARC550 (SEC ID N°: 56)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC551 (SEC ID N°: 57)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

40

ARC552 (SEC ID N°: 58)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGTfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

45

ARC553 (SEC ID N°: 59)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC554 (SEC ID N°: 60)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGTfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

50

ARC 657 (SEC ID N°: 61)

PEG 20 kDa-NH-fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG -3T

ARC 658 (SEC ID N°: 62)

**30 kDa PEG-NH-**

**fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T**

5

ARC 672 (SEC ID N°: 63)

**NH2-**

**fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T**

ARC706 (SEC ID N°: 64)

**10 kDa PEG-NH-**

**fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T**

10

ARC1537 (SEC ID N°: 65)

**40kDa PEG-NH-**

**fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T**

15

ARC1730 (SEC ID N°: 66)

**PEG20K-NH-**

**fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-NH-PEG20K**

ARC1905 (SEC ID N°: 67)

40K PEG-NH-fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

20

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

ARC243 (SEQ ID NO: 68)

GGFCGAfUfUAfCfUGGAfCGGAfCfUfCGfCGAfuGfUGAGfCfCAGAfCGAfCfUfCGfCfC

25

ARC244 (SEQ ID NO: 69)

GGfCfUfUfCfUGAAGAfUfUAfUfUfUfUfCGfCGAfuGfUGAAfCfUfCfCAGAfCfCfCfC

30

La divulgación comprende adicionalmente los aptámeros en la Tabla 2 más adelante. Los aptámeros en la Tabla 2 se listan en la dirección 5' a 3', y representan la secuencia de ribonucleótidos de los aptámeros que se seleccionaron en las condiciones dRmY de SELEX™ proporcionadas. En algunas realizaciones de la invención derivadas de esta selección (como se refleja en el listado de secuencias) las purinas (A y G) son desoxi, y las pirimidinas (U y C) son 2'-OMe. En algunas realizaciones, los aptámeros comprenden un tapón (por ejemplo, una dT invertida 3'). En algunas realizaciones, los aptámeros comprenden un PEG.





Otros aptámeros de la invención que se unen a la proteína de complemento C5 se describen más adelante en el Ejemplo 3. Los aptámeros específicos de C5 se describen adicionalmente en las Solicitudes Provisionales de Patente de los Estados Unidos 60/544.542, 60/547.747, 60/581.685 y 60/608.048 (véase el documento WO 05/079363).

5 En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos de aptámero de la presente invención tienen gran afinidad y especificidad por sus dianas a la vez que se reducen los efectos secundarios perjudiciales de las sustituciones de nucleótidos que suceden de manera no natural si los agentes terapéuticos de aptámero se rompen en el cuerpo de los pacientes o sujetos. En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas que contienen los agentes terapéuticos de aptámero de la presente invención están libres o tienen una cantidad reducida de nucleótidos fluorados.

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

20 La invención también incluye el uso de los aptámeros anti-C5 de la invención con aptámeros específicos para PDGF y/o VEGF y/o sus receptores afines PDGFR y VEGFR, respectivamente, en los métodos de la invención para estabilizar, tratar y/o prevenir trastornos oculares. Por consiguiente, los métodos descritos inmediatamente antes pueden usarse para generar aptámeros de la invención para bloquear la unión de un ligando (por ejemplo, PDGF o VEGF) con su diana, tal como un receptor afín.

25 Los ejemplos de aptámeros anti-PDGF para su uso en los métodos de la invención se divulgan en la Solicitud Internacional de Patente N° PCT/US2005/039975 (documento WO 2006/050498) presentada el 2 de noviembre de 2005, en particular, ARC513, ARC594, ARC127 y ARC404 divulgados en esta.

30 Los ejemplos de aptámeros específicos de VEGF para su uso en los métodos de la invención se divulgan en las Patentes de los Estados Unidos N° 5.919.455, 5.932.462, 6.113.906, 6.011.020, 6.051.698 y 6.147.204. Por ejemplo, un aptámero particularmente útil para su uso en el tratamiento de trastornos oculares en combinación con un agente anti-C5 de la invención puede ser EYE001 (anteriormente NX1838) en su forma pegilada y no pegilada, en particular, inyección de pegaptanib sódico (Macugen®, Eyetech Pharmaceuticals, Inc. y Pfizer, Inc. NY, NY).

35 La invención también incluye el uso de los aptámeros anti-C5 de la invención con aptámeros para PDGF y/o VEGF y/o sus receptores afines PDGFR y VEGFR, respectivamente, en los métodos de la invención para estabilizar, tratar y/o prevenir trastornos oculares.

40 Los ejemplos de aptámeros anti-PDGF para su uso en los métodos de la invención se divulgan en la Solicitud Internacional de Patente N° PCT/US2005/039975 (documento WO 2006/050498) presentada el 2 de noviembre de 2005, en particular, ARC513, ARC594, ARC127 y ARC404 divulgados en esta.

45 Los ejemplos de aptámeros específicos de VEGF para su uso en los métodos de la invención se divulgan en las Patentes de los Estados Unidos N° 5.919.455, 5.932.462, 6.113.906, 6.011.020, 6.051.698 y 6.147.204. Por ejemplo, un aptámero particularmente útil para su uso en el tratamiento de trastornos oculares en combinación con un aptámero anti-complemento, en particular un aptámero anti-C5, de la invención puede ser EYE001 (anteriormente NX1838) en su forma pegilada y no pegilada, en particular, inyección de pegaptanib sódico (Macugen®, Eyetech Pharmaceuticals, Inc. y Pfizer, Inc. NY, NY).

#### 50 Composiciones Farmacéuticas

Esta divulgación también incluye composiciones farmacéuticas que contienen un agente anti-C5, en particular moléculas de aptámero que se unen a la proteína de complemento C5, en particular, un aptámero que se une a la proteína de complemento C5 y evita su escisión. Las composiciones pueden ser adecuadas para uso interno e incluyen una cantidad efectiva de un compuesto farmacológicamente activo de la invención, solo o en combinación, con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos son especialmente útiles en que tienen una toxicidad muy baja, en caso de que la hubiese.

60 Las composiciones 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 divulgación pueden usarse para tratar o prevenir DMAE no exudativa.

Las composiciones pueden usarse para estabilizar la DMAE de tipo no exudativo ("seca").

65 Las composiciones son útiles para su administración a un sujeto que padece, o está predispuesto a, una enfermedad o trastorno que está relacionado o se deriva de la proteína de complemento C5. Las composiciones son

especialmente útiles para su administración a un sujeto que padece, o está predispuesto a DMAE de tipo no exudativo.

Se proporcionan composiciones para el tratamiento de sujetos que tienen o están en riesgo de padecer DMAE de tipo no exudativo. En algunas realizaciones, los sujetos en riesgo son aquellos que tienen drusas y/o cambios en la pigmentación retiniana pero no tienen pérdida de agudeza visual. Las drusas se detectan usando un oftalmoscopio, apareciendo normalmente como puntos amarillos y partículas contra el fondo rojo de la retina. La pérdida clínica de agudeza visual es la demostración de la reducción de la visión de 1 a 3 líneas usando el diagrama del estudio para el tratamiento temprano de la retinopatía diabética ("diagrama ETDRS"). Otros cambios en la visión asociados con la degeneración macular incluyen distorsiones y/o puntos ciegos (escotoma) detectados usando una rejilla Amsler, cambios en la adaptación a la oscuridad (diagnóstico de la salud de los bastones) o cambios en la interpretación del color (diagnóstico de la salud de los conos). En algunas realizaciones, los sujetos en riesgo son aquellos que tienen una variación en el factor H del sujeto en comparación con el tipo silvestre. Véase, por ejemplo, las variaciones descritas en Edwards et al., Science vol 308, págs. 421- 422 (2005), Hageman, G. et al., PNAS, vol. 102, págs. 7227-7231 (2005), y Haines, J. et al., Science, vol. 308, págs 419-421 (2005). En algunas realizaciones, los sujetos en riesgo son aquellos que tienen una combinación de drusas, no pérdida de agudeza visual y una variación en el factor H de complemento. En algunas realizaciones, los sujetos en riesgo son aquellos en los que se detectan drusas. En algunas realizaciones, los sujetos en riesgo a tratar son aquellos en los que se detectan drusas y hay una pérdida clínica de agudeza visual y/o otros cambios en la visión.

Pueden usarse composiciones en un método para tratar a un paciente o sujeto que padece DMAE de tipo no exudativo. Los métodos incluyen administrar al paciente o sujeto un aptámero específico de C5 o una composición que comprenda al mismo, de tal forma que el aptámero anti-C5 se une a la proteína C5 de complemento, de tal forma que a unión de la proteína C5 de complemento altera su función biológica, por ejemplo, evitando su escisión *in vivo*, por lo tanto tratando la patología mediada por C5 (DMAE de tipo no exudativo). La unión del aptámero específico de C5 reduce el nivel de expresión de VEGF y/o PDGF y/o bFGF y/o otros factores de crecimiento que estimulan el crecimiento de células endoteliales, en particular en el tejido retiniano, de células RPE, vasos coroidales y/o capilares retinales, en los pacientes, de este modo tratando trastornos mediados por VEGF y/o PDGF, en particular trastornos de neovascularización ocular, tales como DMAE.

En una realización, el aptámero anti-C5 de la invención se administra, por vía ocular o periocular, a un sujeto en una cantidad suficiente para reducir el nivel de expresión de VEGF y/o PDGF *in vivo*. En una realización particular de los métodos de la invención, el sujeto al que se administra el aptámero anti-complemento, en particular un aptámero anti-C5 de la invención, se identifica por tener o estar en riesgo de un trastorno de neovascularización ocular en el que la expresión reducida de VEGF y/o PDGF ayude en la prevención, estabilización y/o reducción de al menos un síntoma del trastorno de neovascularización ocular.

El paciente o sujeto tratado mediante los métodos de esta invención puede ser un vertebrado, más particularmente un mamífero, o más particularmente, un ser humano.

En la práctica, los aptámeros específicos de C5 de la invención o sus sales o profármacos 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, evitar la escisión de una proteína diana.

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

La "terapia de combinación" (o "co-terapia") incluye la administración de la composición de aptámero específico de C5 de la invención y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico que pretende proporcionar el efecto beneficioso de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero sin limitación, co-acción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación se efectúa normalmente durante un periodo de tiempo definido (generalmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). En algunas realizaciones, el segundo agente puede ser un agente anti-VEGF y/o un agente anti-PDGF.

En realizaciones de los métodos anteriormente descritos, donde el método comprende adicionalmente la etapa de

administrar al sujeto un agente anti-VEGF, el agente anti-VEGF puede seleccionarse del grupo que consiste en: una molécula de ácido nucleico, un aptámero, una molécula antisentido, una molécula de ARNi, una proteína, un péptido, un péptido cíclico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un azúcar, un polímero, y una molécula pequeña.

5 En realizaciones de los métodos anteriormente descritos, donde el método comprende adicionalmente la etapa de administrar al sujeto un agente anti-PDGF, el un agente anti-PDGF puede seleccionarse del grupo que consiste en: una molécula de ácido nucleico, un aptámero, una molécula antisentido, una molécula de ARNi, una proteína, un péptido, un péptido cíclico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un azúcar, un polímero, y una molécula pequeña.

10 En algunas realizaciones de los métodos anteriormente descritos, donde el método comprende además administrar un agente anti vascular al sujeto, el agente antivascular es un derivado de porfirina. En algunas realizaciones el derivado de porfirina es verteporfina para inyección (Visudyne®, Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ). En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de activar el derivado de porfirina con luz láser.

15 La "terapia combinada" puede, pero no generalmente, estar pensada para abarcar la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia separados que accidentalmente, y de manera arbitraria, den como resultado las combinaciones de la presente invención. La "terapia combinada" está pensada para abarcar la administración de estos agentes terapéuticos de modo secuencial, es decir, en que cada agente terapéutico se administra a un tiempo distinto, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de manera sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea puede lograrse, por ejemplo, mediante la administración al sujeto de una sola cápsula que tenga una proporción fija de cada agente terapéutico o en múltiples cápsulas individuales para cada uno de los agentes terapéuticos. En otra realización, la administración simultánea puede lograrse, por ejemplo, mediante la administración al sujeto de una sola jeringa que tenga una proporción fija de cada agente terapéutico o en múltiples cápsulas individuales para cada uno de los agentes terapéuticos.

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

25 Como alternativa, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía tópica o todos los agentes terapéuticos pueden administrarse mediante inyección. La secuencia en la que los agentes terapéuticos se administran no es estrictamente crítica a menos que se indique lo contrario. La "terapia combinada" también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos tal como se describen anteriormente en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos. En los casos donde la terapia combinada comprende un tratamiento sin fármacos, el tratamiento sin fármacos puede efectuarse en cualquier momento adecuado siempre se logre que el efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento sin fármacos. Por ejemplo, en los casos adecuados, el efecto beneficioso se logra aun cuando el tratamiento sin fármacos se retira temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizá durante días o incluso semanas.

30 Las composiciones terapéuticas o farmacológicas de la presente invención comprenderán generalmente una cantidad efectiva del componente activo (o los componentes activos) de la terapia, disueltos o dispersos en un medio farmacéuticamente aceptable. Los medios farmacéuticamente aceptables o vehículos incluyen a cualquiera y a todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos o retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios en las composiciones terapéuticas de la presente invención.

35 La preparación de composiciones farmacéuticas o farmacológicas será conocido por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. normalmente, dichas composiciones pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección; como comprimidos u otros sólidos para administración oral; como cápsulas de liberación controlada; o en cualquier otra forma usada actualmente, incluyendo gotas oculares, cremas, lociones, salvas, inhalantes y similares. El uso de formulaciones estériles, tales como enjuagues basados en suero salino, por cirujanos, médicos o trabajadores del cuidado de la salud para tratar una zona particular en el campo de operación también puede ser particularmente útil. Las composiciones también pueden administrarse mediante un microdispositivo, micropartícula o esponja.

40 Tras la formulación, los agentes terapéuticos pueden administrarse de un modo compatible con las formulación de dosificación, y en una cantidad tal que sea farmacológicamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en varias formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, aunque

también pueden usarse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

En este contexto, la cantidad de ingrediente activo y volumen de composición a administrar depende del animal hospedador a tratar. Las cantidades precisas de compuesto activo necesarias para la administración dependen del juicio del médico y son peculiares para cada individuo.

Se utiliza normalmente un volumen mínimo de una composición necesario para dispersar los compuestos activos. Los regímenes adecuados para la administración también son variables, pero pueden tipificarse administrando inicialmente el compuesto y controlando los resultados y después dando dosis controladas adicionales a intervalos adicionales.

Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), el componente de fármaco activo puede combinarse con un vehículo oral inerte 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 aluminio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona, azúcares naturales, tales como glucosa o beta-lactosa, endulzantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábica, tragacanto o alginato de sodio, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, almidones de goma xantana, agar, ácido alginico o su sal sódica, o mezclas efervescentes, y similares. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse en dichas formas orales como comprimidos o cápsulas de liberación retardada y liberación sostenida, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones.

Las composiciones inyectables son preferentemente soluciones o suspensiones acuosas isotónicas, y los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones se pueden esterilizar y/o incluir 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 de acuerdo con métodos convencionales de mezclado, granulado o recubrimiento, respectivamente, y contienen normalmente de aproximadamente un 0,1 a un 75%, preferentemente de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 50%, del principio activo.

Las composiciones líquidas, en particular las inyectables, pueden prepararse, por ejemplo, mediante disolución, dispersión, etc. El principio 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 de este modo formar la solución o suspensión inyectable. Adicionalmente, pueden formularse formas sólidas adecuadas para disolución en líquido antes de la inyección.

Los compuestos de la invención pueden administrarse en forma intravenosa (tanto en bolo como en infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, todas usando formas bien conocidas para el experto habitual en la técnica farmacéutica. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones.

La administración parenteral inyectable se usa generalmente para inyecciones e infusiones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Adicionalmente, una estrategia para administración parenteral emplea el implante de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, que aseguran que se mantenga un nivel constante de dosificación, de acuerdo con la Patente de los Estados Unidos N° 3.710.795.

Además, los compuestos preferidos para la presente invención pueden administrarse de forma intranasal mediante el uso tópico de vehículos intranasales adecuados, inhalantes, o mediante vías transdérmicas, usando aquellas formas de parches transdérmicos para la piel bien conocidos para el experto habitual en la técnica. Al administrarse en forma de un sistema de dispensación transdérmica, la administración de la dosis será, por supuesto, continua en vez de intermitente a lo largo del régimen de dosificación. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, pomadas, lociones, pulverizadores de aerosol y geles, en los que la concentración del ingrediente activo estará normalmente en el intervalo del 0,01% al 15%, p/p o p/v.

Para las composiciones sólidas, pueden usarse excipientes que incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. El compuesto activo definido anteriormente también puede formularse como supositorios usando, por ejemplo, polialquilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol, como vehículo. En algunas realizaciones, los supositorios

se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de dispensación de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares.

5 Los liposomas pueden formarse a partir de varios fosfolípidos que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, se hidrata una película de componentes lipídicos con una solución acuosa de fármaco para formar una capa lipídica que encapsula al fármaco, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.262.564. Por ejemplo, las moléculas de aptámero descritas en el presente documento pueden  
10 proporcionarse como un complejo con un compuesto lipófilo o no inmunogénico de elevado peso molecular construido usando métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de complejos asociados a ácidos nucleicos se proporciona en la Patente de los Estados Unidos 6.011.020.

Los compuestos de la presente invención pueden también acoplarse con polímeros solubles como transportadores de fármaco que pueden usarse como diana. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de  
15 pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polihidroxietilspanamida-fenol, o polietilenoóxipolisina sustituida con restos de palmitoilo. Además, los compuestos de la presente invención pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianocrilatos y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

En una realización preferida, los compuestos de la presente invención pueden dispensarse en el compartimento ocular mediante una inyección intravítrea, peri-ocular, intracameral, subconjuntival, o trans esclerótica en la cavidad  
20 ocular o directamente en el tejido (o tejidos) ocular o periocular. Los compuestos de la invención pueden inyectarse en el espacio subtenoniano o en el espacio retrobulbar. Los compuestos de la invención también pueden administrarse al compartimento ocular del tejido a través de sangre sistémica y fluido en el ojo y sus tejidos y de este modo se administra mediante inyección sistémica parenteral, mediante vías de administración intravenosas, intramusculares o subcutáneas. La administración subconjuntival, intravítrea o trans-esclerótica de las composiciones farmacéuticas de la invención puede ser útil como un suplemento a la administración sistémica de un agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades oculares y/o enfermedades sistémicas con manifestaciones  
25 oculares. En algunas realizaciones de los métodos de la invención para estabilizar, tratar y/o prevenir la retinopatía diabética y/o la enfermedad de Behcet, el aptámero anti-complemento no se administra sistémicamente, se administra preferentemente por vía ocular.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse al compartimento ocular o tejido en depósito  
35 o gel de liberación sostenida de formulación polimérica mediante implante quirúrgico de un sistema de polímero biodegradable de tamaño microscópico, por ejemplo, un microdispositivo, micropartículas, o esponja, u otros dispositivos de liberación lenta transesclerótica, implantados durante el tratamiento de una enfermedad oftalmológica, o mediante un dispositivo de dispensación ocular, por ejemplo, un dispositivo de dispensación sostenida de lente de contacto polimérica. Los compuestos de la invención también pueden administrarse al  
40 compartimento ocular o tejido por vía tópica, por ejemplo, en forma de gotas oculares, en forma de una lente de contacto cargada con el compuesto de la invención, o mediante iontoforesis usando corriente eléctrica para dirigir al fármaco desde la superficie hasta la parte posterior del ojo.

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

El régimen de dosificación utilizando los aptámeros se selecciona de acuerdo con varios factores incluyendo el tipo, especie, edad, peso, sexo y estado médico del paciente; la gravedad de la afección a tratar; la vía de administración;   
50 la función renal y hepática del paciente; y el aptámero particular o sal del mismo empleado. Un médico experto o veterinario podrá determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva del fármaco necesaria para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

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

Las dosificaciones infusionadas, dosificaciones intranasales y dosificaciones transdérmicas de la composición de aptámero de la presente invención estarán en el intervalo de entre 0,05 a 7500 mg/día. Las dosificaciones subcutáneas, intravenosas e intraperitoneales de la composición de aptámero de la presente invención estarán en el intervalo de entre 0,05 a 3800 mg/día.

Las dosificaciones oculares de las composiciones de aptámero de la presente invención estarán en el intervalo de

entre 0,001 a 10 mg/ ojo administradas por vía ocular, por ejemplo, mediante inyección intravítrea, desde una vez a la semana hasta una vez cada tres meses o mediante dispositivo o formulación de liberación sostenida.

5 Los niveles efectivos en plasma de los compuestos de aptámero de la presente invención están en el intervalo de 0,002 mg/ml a 50 mg/ml. Los niveles oculares efectivos de los compuestos de aptámero de la invención pueden estar en el intervalo de 20 nM a 250 nM.

#### Efectividad del tratamiento

#### 10 Trastornos neovasculares

La efectividad del tratamiento de un trastorno neovascular, por ejemplo, DMAE, en particular DMAE de tipo exudativo o retinopatía diabética, se evalúa mediante cualquier método aceptado para medir si se frena o disminuye la angiogénesis. Esto incluye la observación directa y la evaluación indirecta, tal como evaluando síntomas subjetivos o indicadores fisiológicos objetivos. La eficacia del tratamiento, por ejemplo, puede evaluarse basándose en la prevención, estabilización y/o reversión de la neovascularización, microangiopatía, filtrado vascular o edema vascular o cualquier combinación de los mismos. La eficacia del tratamiento para evaluar la supresión de un trastorno neovascular ocular también puede definirse en términos de estabilización o mejora de la agudeza visual.

20 En la determinación de la efectividad de solo un agente anti-C5 o en combinación con un agente anti-VEGF y/o agente anti-PDGF para estabilizar, reducir un síntoma y/o prevenir un trastorno neovascular ocular, los pacientes pueden ser evaluados clínicamente por un oftalmólogo varios días después de la inyección y justo antes de la siguiente inyección. También pueden efectuarse mensualmente las agudezas visuales de ETDRS, fotografía Kodachrome, y angiografía de fluoresceína.

25 En la determinación de la efectividad de solo un aptámero anti-complemento o en combinación con un agente anti-VEGF y/o agente anti-PDGF para estabilizar, reducir un síntoma y/o prevenir un trastorno neovascular ocular, los pacientes pueden ser evaluados clínicamente por un oftalmólogo varios días después de la inyección y justo antes de la siguiente inyección. También pueden efectuarse mensualmente las agudezas visuales de ETDRS, fotografía del fondo de ojo, tomografía de coherencia óptica y angiografía de fluoresceína.

30 Por ejemplo, para determinar la efectividad de un agente anti-C5, en particular un aptámero específico de C5 solo o en combinación con un agente anti-VEGF y/o un agente anti-PDGF, para tratar la neovascularización ocular, se han llevado a cabo estudios que incluyen la administración de inyecciones intravítreas simples o múltiples de un agente anti-C5, en particular, un aptámero específico de C5 solo o en combinación con un agente anti-VEGF y/o un agente anti-PDGF en pacientes que padecen neovascularización coroidea subfoveal secundaria a degeneración macular asociada a la edad de acuerdo con métodos estándar bien conocidos en la técnica oftalmológica. Los pacientes con neovascularización coroidea subfoveal (CNV) secundaria a la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) pueden recibir una sola inyección intravítrea de un agente anti-C5, en particular, un aptámero específico de C5 y/o un aptámero específico de VEGF y/o un aptámero específico de PDGF. La efectividad se controla, por ejemplo, mediante evaluación oftalmológica y/o angiografía de fluoresceína. Los pacientes que muestran una visión estable o mejorada tres meses después del tratamiento, por ejemplo, que demuestran una línea 3 o una mejora mayor en la visión en el diagrama de ETDRS, se toman como receptores de una dosificación efectiva.

#### 45 EJEMPLO 1

##### **Actividad de aptámero anti-C5 en las vías de complemento clásica y alternativa**

##### Ejemplo 1A: Ensayo de hemólisis.

50 El ensayo CH50 mide la capacidad del sistema de complemento en una muestra de suero para lisis el 50 % de las células en una suspensión estandarizada de eritrocitos de oveja recubiertos de anticuerpo. Se mezcló una solución de suero humano al 0,2 % con eritrocitos de oveja recubiertos de anticuerpos (Kit Diamedix EZ Complement CH50, Diamedix Corp., Miami, FL) en presencia o ausencia de varios aptámeros anti-C5. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del kit en solución salina tamponada con veronal que contiene calcio, magnesio y gelatina al 1 % (tampón de complemento GVB++) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se centrifugaron las muestras para precipitar los eritrocitos intactos. La densidad óptica a 412 nm (DO<sub>412</sub>) del sobrenadante se leyó para cuantificar la liberación de hemoglobina soluble, que es proporcional al alcance de la hemólisis (Green et al., (1995) Chem. Biol. 2:683-95). Para verificar que los aptámeros bloquearon la activación de C5, se analizaron algunos sobrenadantes de la hemólisis para presencia de C5a y C5b-9 mediante ELISA (kit ELISA de C5b-9, Quidel, San Diego, CA, kit ELISA C5a, BD Biosciences San Diego, CA) siguiendo los protocolos del kit de ELISA.

65 La adición de un aptámero anti-C5 no PEGilado (ARC 186) (SEC ID N°: 4) a la mezcla de reacción inhibió la hemólisis de modo dependiente de la dosis, como se muestra en la gráfica de la Figura 7A, con una CI<sub>50</sub> de 0,5 ± 0,1 nM, (véase la Figura 7B), un valor que es coherente con la K<sub>D</sub> determinada mediante filtración en nitrocelulosa. A

concentraciones muy altas de aptámero (> 10 nM), el alcance de la hemólisis fue esencialmente indistinguible del fondo (sin suero añadido), lo que indica que ARC186 (SEC ID N°: 4) fue capaz de bloquear por completo la actividad de complemento. La conjugación del aptámero ARC186 (SEC ID N°: 4) con grupos PEG de 20 kDa (ARC657; SEC ID N°: 61), 30 kDa (ARC658; SEC ID N°: 62), (1,3- bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida) ramificada de 40 kDa (ARC187; SEC ID N°: 5), (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo) ramificado de 40 kDa (ARC1905; SEC ID N°: 67), lineales de 40 kDa (ARC1537; SEC ID N°: 65), y lineal de 2 x 20 kDa (ARC1730; SEC ID N°: 66) tuvo poco efecto sobre la actividad inhibitoria del aptámero en el ensayo de hemólisis de CH50 (Figura 7A - Figura 7D).

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

Los análisis de ELISA de los sobrenadantes de la hemólisis indicaron que esta inhibición funcional se correlacionó con el bloqueo de la liberación de C5a. Por tanto, los datos de la hemólisis demuestran que ARC186 (SEC ID N°: 4), y sus conjugados PEGilados, son inhibidores de complemento elevadamente potentes que funcionan bloqueando la activación de C5 catalizada por convertasa.

Los ensayos de hemólisis con material no PEGilado indicaron que el aptámero anti-C5 no reacciona de manera cruzada con C5 a partir de un número de especies de no primates, incluyendo rata, cobaya, perro y cerdo. Sin embargo, se observó una actividad inhibitoria significativa en evaluaciones de suero de primate, incluyendo suero de macaco cinomolgo, macaco Rhesus y chimpancé. La eficacia *in vitro* del aptámero anti-C5 se investigó adicionalmente en suero de cinomolgo usando ARC658 (SEC ID N°: 62), el análogo de PEG de 30 kDa de ARC186 (SEC ID N°: 4). En una comparación de lado a lado (n = 3), ARC658 inhibió la actividad de complemento humana con una  $CI_{50}$  de  $0,21 \pm 0,0$  nM y la actividad de complemento de cinomolgo con una  $CI_{50}$  de  $1,7 \pm 0,4$  nM (Figura 8). Por lo tanto, ARC658 (SEC ID N°: 62) es 8 ± 3 veces menos potentes en suero de cinomolgo en comparación con el humano mediante esta medida.

En un estudio relacionado, se investigaron los efectos del aptámero anti-C5 PEGilado con (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo) ramificado de 40 kDa, ARC195 (SEC ID N°: 67) sobre la activación de la vía de complemento clásica ensayado mediante hemólisis de eritrocitos de oveja en presencia de suero humano (Innovative Research, Southfield, MI), de mono cinomolgo (Bioreclamation, Hicksville, NY) o de rata (Bioreclamation, Hicksville, NY). Estos ensayos se efectuaron en suero altamente diluido, 0,1 % para humano y mono cinomolgo, y 0,3 % para rata, en las mismas condiciones usadas para comparar los efectos inhibitorios de ARC1905 frente a ARC672 en la hemólisis de eritrocitos de oveja descrita justo antes. En una comparación de lado a lado, la inhibición completa (90-99 %) de la actividad de complemento *in vitro* fue obtenible con ARC1905 en sueros tanto de humano como de mono cinomolgo, mientras que ARC1905 mostró una actividad de pequeña a no específica en la muestra de complemento de rata (Figura 59A). De manera similar a ARC658, ARC1905 fue ~10 veces menos potente contra la actividad de complemento de cinomolgo en las condiciones del ensayo, como se refleja en los valores de  $CI_{90}$  y  $CI_{99}$  expuestos en la Figura 59B.

Ensayos de unión a filtro de nitrocelulosa. Los aptámeros individuales se marcaron con  $^{32}P$  en el extremo 5' mediante incubación con  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP y cinasa de polinucleótidos (New England Biolabs, Beverly, MA). El aptámero radiomarcado se separó mediante purificación del ATP libre mediante filtración en gel seguido de electroforesis en gel de poli(acrilamida). Para medir la afinidad del aptámero anti-C5, se incubó el aptámero radiomarcado (<10 pM) con concentraciones en aumento (0,05 - 100 nM) de proteína C5 purificada (Quidel, San Diego, CA) en suero salino tamponado con fosfato que contenía  $MgCl_2$  1 mM a temperatura ambiente (23 °C) y a 37 °C, durante 15 minutos y a intervalos de tiempo de 4 horas. Las reacciones de unión se analizaron mediante filtración en nitrocelulosa usando un Minifold I dot-blot, colector de filtración al vacío de 96 pocillos (Schleicher & Schuell, Keene, NH). Se usó un



medio de filtración de tres capas, que consiste (de arriba a abajo) de nitrocelulosa Protan (Schleicher & Schuell), nylon Hybond-P (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y papel de transferencia de gel GB002 (Schleicher & Schuell). La capa de nitrocelulosa, que se une selectivamente a proteínas por encima de ácidos nucleicos, retuvo preferentemente el aptámero anti-C5 en complejo con un ligando proteico, mientras que no pasó aptámero anti-C5  
 5 complejado a través de la nitrocelulosa y se adhirió al nylon. El papel de transferencia de gel se incluyó solo como medio de soporte para otros filtros. Después de filtración, se separaron las capas de filtro, se secaron y se expusieron a una pantalla phosphor (Amersham Biosciences) y se cuantificaron usando un sistema de formación de imágenes de transferencia Storm 860 Phosphorimager® (Amersham Biosciences).

Como se muestra en la Figura 9 y en la Figura 10, las concentraciones en aumento de C5 potencian la proporción de ARC186 capturado sobre la membrana de nitrocelulosa. La dependencia de ARC186 unido a concentraciones en aumento de C5 se describe bien por un modelo de unión a un solo sitio ( $C5 + ARC186 \leftrightarrow X5 \cdot APX186$ ; % unido =  $C_{m\acute{a}x} / (1 + K_D / [C5])$ ;  $C_{m\acute{a}x}$  es el máximo de % unido en saturación de  $[C5]$ ;  $K_D$  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 y 37 °C son esencialmente indistinguibles dentro del error, ajustándose con valores de  $K_D$  de 0,5 - 0,6 nM (Figura 9). Las diferencias entre las curvas de unión a 23 y 37 °C se hacen más pronunciadas cuando se aumenta el tiempo de incubación. 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 sin cambios ( $0,6 \pm 0,1$  nM).

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

Para analizar la disociación de  $C5 \cdot ARC186$ , se pre-equilibró ARC186 radiomarcado ( $\leq 10$  pM) con proteína C5 5 nM en suero salino tamponado con fosfato que contenía  $MgCl_2$  1 mM a temperatura ambiente (23 °C). La reacción de disociación se inició mediante la adición de ARC196 no marcado (1  $\mu$ M), que actúa como trampa para C5 libre, y se detuvo mediante particionado de filtración en nitrocelulosa de ARC186 radiomarcado unido y libre. Se obtuvo un curso temporal de disociación de ARC186 variando la duración entre la iniciación de la reacción de disociación y la filtración. El curso temporal de la disociación, observado como una disminución en el porcentaje de ARC radiomarcado capturado sobre el filtro de nitrocelulosa (igual al porcentaje unido a C5), se describe bien por una disminución exponencial simple donde el % de ARC186 unido =  $100 \times e^{-k_{-1}t}$  (véase la Figura 11). El valor de la constante de velocidad de disociación,  $k_{-1}$ , determinado mediante este método es  $0,013 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ , correspondiente a una semivida ( $t_{1/2} = \ln 2 / k_{-1}$ ) de  $53 \pm 8$  min.

Para analizar la reacción de asociación, se midió la constante de velocidad de equilibración ( $K_{eq}$ ) para la formación de  $C5 \cdot ARC186$  en presencia de concentraciones variantes de proteína C5 (1 - 5 nM). La formación de complejos se inició mezclando juntos proteína C5 y ARC186 radiomarcado en PBS que contiene  $MgCl_2$  1 mM a temperatura ambiente (23 °C), y se detuvo mediante particionado mediante filtración en nitrocelulosa. Como se describe para las reacciones de disociación, se obtuvo un curso temporal de formación de complejos variando la duración entre la iniciación de la reacción y la filtración. El curso temporal de equilibrado, observado como un aumento en el porcentaje de ARC186 radiomarcado capturado sobre el filtro de nitrocelulosa, está bien descrito por una disminución exponencial simple donde el % de ARC186 unido =  $100 \times (1 - e^{-k_{eq}t})$ . Los lapsos de tiempo de equilibrado para C5 1, 2 y 4 nM se muestran en la Figura 12. Como era de esperar, 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  $k_{eq} = k_1 [C5] + k_{-1}$ . Por tanto, se deriva una estimación de  $k_1$  a partir de la pendiente de una representación de  $k_{eq}$  frente a  $[C5]$  (véase el recuadro de la Figura 12), en este caso  $0,18 \pm 0,01 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

Estos datos indican que, en condiciones de baja concentración de C5 (por ejemplo, 0,1 nM), se necesita una incubación extendida para que la mezcla de C5 y ARC 186 alcance el equilibrio. En estas condiciones,  $k_{eq} = (0,18 \pm 0,01 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}) (0,1 \text{ nM}) + 0,013 \text{ min}^{-1} = 0,03 \text{ min}^{-1}$ , correspondiente a una semivida de 22 minutos. Por lo tanto, aproximadamente 2 horas de incubación a temperatura ambiente (~5 semividas) son necesarias para un equilibrado completo (> 95 %). Un tiempo corto de incubación (por ejemplo, 15 minutos) estimará a la baja de manera significativa la afinidad real del complejo, como se muestra anteriormente en las afinidades observadas para una incubación de 15 minutos ( $K_D = 0,5$  nM) frente a una de 4 horas ( $K_D = 0,08$  nM). Una estimación alternativa de la  $K_D$  a temperatura ambiente puede calcularse a partir de los datos cinéticos de acuerdo con la relación  $K_D = k_{-1} / k_j$ . En este caso, la  $K_D$  calculada es  $0,07 \pm 0,01$  nM, lo que es completamente coherente con la  $K_D$  determinada anteriormente mediante métodos termodinámicos.

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

Los resultados ilustrados en la Figura 13 muestran que el aptámero no reconoce esencialmente a C5a ( $K_D \gg 3$  mM), aunque muestra una afinidad débil por C5b-9 soluble ( $K_D > 0,2$  mM), presumiblemente debido a interacciones con el componente C5b. Otros componentes de complemento muestran afinidad de moderada a débil por el aptámero. C3 no activado no se une esencialmente al aptámero; sin embargo, el factor H ( $K_D \sim 100$  nM) y, hasta un alcance mucho menor, C1q ( $K_D > 0,3$  mM) se unen. En su conjunto, los datos indican que ARC186 (SEC ID N°: 4) se une con alta afinidad a C5 humano, principalmente a través del reconocimiento del dominio C5b. Por tanto, ARC186 y sus derivados PEGilados, por ejemplo, ARC1905 no debe interferir con la generación de C3b, que es importante para la opsonización bacteriana, o con el control innato de la activación de C' mediante factores reguladores.

La conjugación de aptámeros con restos de PEG de elevado peso molecular introduce la posibilidad de impedancia estérica que conduce a una afinidad reducida. Los aptámeros modificados con PEG no se evalúan fácilmente para unión directa mediante ensayos de filtración en nitrocelulosa debido a la tendencia de estos aptámeros a unirse a nitrocelulosa incluso en ausencia de proteína diana. Sin embargo, las afinidades relativas de estos aptámeros pueden determinarse a partir de su capacidad comparativa para competir con aptámero radiomarcado no PEGilado (<10 pM) por la unión a la diana medidas mediante filtración sobre nitrocelulosa, conocido como ensayo de competición de unión, efectuados a 37 °C. A medida que aumenta la concentración de competidor frío (es decir, no radiomarcado), el porcentaje de aptámero radiomarcado unido a proteína diana disminuye. Tal como se muestra en la Figura 14, aumentar las concentraciones de ARC186 frío (SEC ID N°: 4) o aptámero PEGilado (ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 62), y ARC187 (SEC ID N°: 5) (0,05 - 1000 nM) compite fácilmente con ARC186 radiomarcado (SEC ID N°: 4) por la unión de proteína C5 2 nM. Adicionalmente, las curvas de titulación para todos los cuatro aptámeros prácticamente se solapan, lo que indica que la conjugación a PEG en el caso de ARC657, ARC658 y ARC187 tiene poco o ningún efecto sobre la afinidad del aptámero por C5.

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

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

La dependencia de la temperatura de la interacción entre ARC1905 y C5 también se estimó mediante ensayo de competición. ARC1905 se diluyó en serie para generar una serie de muestras 10X como se describe anteriormente. Las reacciones de unión se equilibraron durante 1 - 4 horas a 25 °C o 37 °C, y después se filtraron sobre el aparato de filtración de nitrocelulosa. La inhibición porcentual se calculó normalizando los datos a reacciones control que carecían de competidor (control de inhibición 0%) o que carecían de proteína C5 (control de inhibición 100%). Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron a partir de representaciones semilogarítmicas del % de inhibición frente a [ARC672] o [ARC1905] mediante un ajuste de los datos a la ecuación: % de inhibición = amplitud  $\times$  [competidor] $^n$  / ( $CI_{50}^n$  + [competidor] $^n$ ). Como se muestra en la Figura 61, ARC1905 se une a C5 con elevada afinidad tanto a 25 °C como a

37 °C. Los valores de  $K_D$  de  $0,15 \pm 0,048$  nM y  $0,69 \pm 0,148$  nM se obtuvieron a 25 °C y 37 °C, respectivamente, a partir de la ordenada en el origen de la  $CI_{50}$  frente a los datos de C5. Ambos valores son coherentes con los valores de  $K_D$  determinados para la interacción de ARC186/C5 descritos anteriormente.

#### 5 Ejemplo 1B: Ensayo en sangre completa.

Se analizó el efecto del aptámero anti-C5 sobre la vía alternativa del sistema de complemento usando el siguiente ensayo en sangre completa. En ausencia de un anticoagulante, se recogió sangre de voluntarios humanos normales. Se incubaron alícuotas de sangre (que no contenían anticoagulante) con concentraciones en aumento de ARC186 (SEC ID N°: 4) durante 5 horas a temperatura ambiente o a 37 °C. Las muestras se centrifugaron para aislar suero y la presencia de C5b en el suero se detectó mediante ELISA de sC5b-9 (kit ELISA C5b-9, Quidel, San Diego, CA). Tal como se muestra en la Figura 15, la actividad anticomplemento, como se refleja por la producción de C5b-9, entre muestras incubadas a diferentes temperaturas divergieron a 3 mM. Los datos de temperatura ambiente indicaron que la concentración de aptámero necesario para la inhibición cuantitativa está en el intervalo de 3-6 mM, mientras que la concentración comunicada de C5 es aproximadamente 400 nM. Estos resultados sugieren que un exceso molar de más de 10 veces de aptámero anti-C5 (ARC186; SEC ID N°: 4) pueden ser necesarios para la inhibición completa de la actividad de C5.

#### 20 Ejemplo 1C Activación de complemento mediante zimosano.

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

En ausencia del aptámero, el tratamiento de zimosano activa ~50 % de C5 de suero o sangre completa, en comparación con una activación de ~1 % en muestra sin tratar. La adición de aptámero anti-C5 hasta 50 nM (~10 % de concentración de C5 en sangre) tuvo poco efecto sobre la formación de sC5b-9. Sin embargo, la titulación de C5 con concentraciones en aumento de ARC658 (SEC ID N°: 62) inhibió la activación de C5 de manera dependiente de la dosis como se observa en la Figura 16. En suero humano o sangre completa, la inhibición cuantitativa (~99 %) se observó a 0,8 - 1 mM de ARC658 (SEC ID N°: 62), correspondiente a ~2 equivalentes molares de aptámero a C5. Se necesitaron concentraciones mayores de aptámero para lograr una inhibición comparable en suero de cinomolgo. En este caso, se logró un 99 % de inhibición solo en presencia de 10 mM de aptámero, o ~20 equivalentes molares de aptámero a C5.

En un estudio similar, los efectos inhibitorios de ARC1905 (la versión PEGilada de (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo) ramificado de 40 kDa de ARC186) se ensayó en muestras humanas y de cinomolgo usando el zimosano para activar el complemento mediante la vía alternativa del modo siguiente. Se suministró zimosano A de *Saccharomyces cerevisiae* por Sigma-Aldrich, Inc. (N° de Cat Z4250-1G, St. Louis, MO). El zimosano A se suministró en polvo y se resuspendió en PBS de Dulbecco (Gibco, Carlsbad, CA, N° de Cat. 14190-144) para producir una suspensión de 50 mg/ml. El suero humano normal agrupado congelado (N° de Cat. IPLA-SER) se compró a Innovative Research (Southfield, MI). El suero de macaco cinomolgo agrupado congelado (N° de Cat. CYNSRM) se compró a Bioreclamation (Hicksville, NY). Se descongelaron viales de 5 - 10 de suero proporcionados por el suministrador a 37 °C, se alícuotaron (~1 ml) y se almacenaron a -20 °C. Las alícuotas se descongelaron según se necesitaron justo antes de su uso mediante incubación a 37 °C y se almacenaron sobre hielo durante los experimentos. La concentración final de suero en cada caso fue ~100 %. Una solución madre 20 mM de ARC1905 se preparó en suero salino al 0,9 % y se diluyó en serie para generar una serie de muestras 10X que cubren un intervalo de ~90 veces de concentración de aptámero. También se incluyó una muestra sin aptámero (solo suero salino) como control negativo (inhibición 0 %).

Se pipetearon 90 µl de suero en pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos (VWR, N° de Cat 1442-9596). Se diluyeron 10 µl de muestra de aptámero directamente en el suero a temperatura ambiente y se mezcló. Se pipetearon 8 µl de zimosano 50 mg/ml en pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos separada. Ambas placas se preincubaron simultáneamente a 37 °C durante 15 minutos. Inmediatamente después de la preincubación, se añadieron 80 µl de la mezcla de suero/aptámero directamente a 8 µl de zimosano y se mezcló, produciendo 5 mg/ml de concentración final de zimosano. La placa de reacción se selló y se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Al final de la incubación, la reacción se inactivó pipeteando 8 µl de EDTA 0,5 M en los pocillos y mezclando. El zimosano se precipitó mediante centrifugación (3700 rpm, 5 min, temperatura ambiente) y ~80 µl de sobrenadante inactivado se transfirieron a una nueva placa de PCR de 96 pocillos y se selló. Los sobrenadantes se congelaron de manera

ultrarrápida en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C. Para controlar la inactivación de fondo independiente de zimosano, se prepararon muestras de suero y se trataron exactamente como se describe anteriormente, excepto que se añadieron 8 ml de suero salino en vez de zimosano.

5 El alcance de la activación de C5 se determinó a partir de los niveles relativos de C5a generados en cada muestra activada por zimosano, según se midió por ELISA de C5a (ALPCO Diagnostics, Windham, NH, N° de Cat. EIA-3327) siguiendo el protocolo del kit ELISA C5a. El kit ELISA C5a incluye reactivos específicos de humano y está formateado para el análisis de C5a humano (hC5a) en plasma o muestras de suero. Por lo tanto fue necesario caracterizar la respuesta del ELISA a C5a de mono cinomolgo usando patrones de concentración de cinomolgo. 10 Para preparar un conjunto de patrones a medida, se incubaron alícuotas de 0,5 ml de humano o de mono cinomolgo con 5 mg/ml de zimosano durante 15 minutos a 37 °C, se inactivaron con 12,5 ml de EDTA 0,5 M y se centrifugó para eliminar el zimosano. La concentración de C5a en la muestra de suero humano activada por zimosano se determinó como aproximadamente 2 mg/ml de hC5a en comparación con patrones en plasma de hC5a proporcionados con el kit. La concentración de C5a en la muestra de mono cinomolgo, expresada en equivalentes humanos de C5a (hC5a eq.), se determinó como aproximadamente 0,6 mg/ml de hC5a eq. Se prepararon series de patrones que cubrían un intervalo desde 0,4 - 400 ng/ml de hC5a o 0,12-120 ng/ml de hC5a eq. mediante dilución en suero de rata (que no interfiere con el ELISA). Los patrones se pretrataron con un reactivo de precipitación de proteínas como se indicaba en el protocolo del kit de ELISA y se aplicaron sin dilución adicional en la placa de ELISA. La placa de ELISA se leyó a una absorbancia máxima de 450 nm ( $A_{450}$ ) usando un lector de absorbancia de placa VersaMax UV/vis (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). La  $A_{450}$  varió con la concentración de C5a desde un mínimo de 0,1 - 0,2 a bajo C5a, estancándose a ~3,5 a alto C5a. Para los fines de cuantificar C5a en las muestras de ensayo, los límites superior e inferior de cuantificación fueron, respectivamente, 25 y 0,78 ng/ml de hC5a para humano, y 15 y 0,94 ng/ml de hC5a eq para mono cinomolgo.  $A_{450}$  frente a ng/ml de hC5a o hC5a eq se representó como se muestra en la Figura 62, y se obtuvo una curva patrón a partir de un ajuste de 4 parámetros a los datos 25 usando la ecuación  $y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D$ .

Justo antes del análisis de C5a, las muestras de ensayo (incluyendo los controles de solo salino y sin zimosano) se pretrataron con reactivo precipitante de proteína como se indicaba en el protocolo del kit de ELISA, después se diluyeron en serie en suero salino al 0,9 %. Los niveles de C5a en muestras de ensayo sin diluir (incluyendo algunos de los controles sin zimosano) excedieron normalmente el límite superior de cuantificación (LSDC). Por lo tanto, las diluciones de 1/5, 1/50 y 1/250 se ensayaron para acomodar el intervalo completo de concentraciones de muestra de ensayo de C5a. Los niveles de C5a se cuantificaron mediante comparación con la curva patrón adecuada (de humano o de mono cinomolgo) y se corrigieron para dilución. El % de inhibición de cada concentración de aptámero se calculó usando la ecuación  $\% inh. = 100 - 100 \times (C5a_{muestra} - C5a_{sin\ zimosano}) / (C5a_{solo\ salino} - C5a_{sin\ zimosano})$ . Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron a partir de una representación del % de inhibición frente a [ARC1905] usando la ecuación  $\%inh = (\% inh.)_{máximo} \times [ARC1905]^n / (CI_{50}^n + [ARC1905]^n) + fondo$ . Los valores de  $CI_{90}$  y  $CI_{99}$  se calcularon a partir de los valores de  $CI_{50}$  usando las ecuaciones  $CI_{90} = CI_{50} \times [90/(100-90)]^{1/n}$  y  $CI_{99} = CI_{50} \times [99/(100-99)]^{1/n}$ . 35

El alcance de la activación de C3 (la etapa en la vía común de complemento justo aguas arriba de C5) se determinó a partir de los niveles relativos de C3a generados en cada muestra activada por zimosano, según se midió por ELISA de C3a (kit de ELISA de Becton-Dickinson OptiEIA C3a, N° de Cat 550499, Franklin Lakes, NJ) siguiendo el protocolo del kit de ELISA de C3a. 40

Justo antes del análisis de C3a, se diluyeron en serie muestras (incluyendo los controles de solo salino y sin zimosano) en suero salino al 0,9 %. El ELISA de C3a es más sensible que aquel para C5a; por tanto, las diluciones de 1/500, 1/5000 y 1/25.000 fueron necesarias para acomodar el intervalo completo de concentraciones de muestra de C3a. Los patrones del kit, derivados de suero humano, se usaron en vez de los patrones a medida preparados para el análisis de C5a. Ya que los niveles de C3a no variaron en gran medida, los patrones específicos de humano proporcionaron una indicación suficiente de sus niveles relativos. 45 50

Los datos generados a partir de los ELISA de C5a y C3 se analizaron usando Microsoft Excel, y los valores de % de inhibición medios se representaron usando Kaleidagraph (v. 3.5.1, Synergy Software). Los valores de  $CI_{50}$ ,  $CI_{90}$  y  $CI_{99}$  se determinaron usando el complemento XLfit 4.1 en Excel. Los efectos comparativos de ARC1905 en la activación de complemento de humano y mono cinomolgo, medidos mediante este enfoque, se resumen en la Figura 63 y Figura 64. Como puede verse en estas Figuras, la inhibición completa de la activación de C5 a través de la vía alternativa se puede lograr *in vitro* con ARC1905 en sueros tanto de humano como de mono cinomolgo. En suero humano, la concentración de ARC1905 necesaria para un 90 % de inhibición de la activación de C5 en una muestra no diluida fue  $442 \pm 23$  nM, aproximadamente equivalente a la concentración molar media de C5. Sin embargo, ARC1905 fue 4 - 6 veces menos potente contra la actividad de complemento de mono cinomolgo en las condiciones del ensayo, como se refleja en los valores de  $CI_{90}$  y  $CI_{99}$ . 55 60

Los efectos de la activación de ARC1905 de C3, medidos por los niveles de C3a, se resumen en la Figura 65. El razonamiento para dirigirse específicamente al extremo de la cola de la vía de complemento es para bloquear las funciones proinflamatorias de C5a y el complejo de ataque a membrana (MAC) sin comprometer las funciones de lucha contra patógenos de factores aguas arriba que culminan en la generación de C3a y C3b. Los datos en la Figura 65 demuestran que ARC1905, hasta 2 mM, no inhibe la generación de C3a e indican que la activación de 65

complemento aguas arriba no está impactada negativamente por ARC1905. El bloqueo esencialmente completo de la activación de C5 de la vía alternativa se logró en muestras de suero tanto humanas como de cinomolgo usando ARC1905. ARC1905 fue aproximadamente un orden de magnitud menos potente en la inhibición de la activación de C5 de mono cinomolgo que la activación de C5 humano en las condiciones de este ensayo. Aunque no se desea estar unidos a teoría alguna, el efecto inhibitorio de ARC1905 sobre la activación de complemento es específica para C5 ya que la activación de C3 no se inhibió.

#### Ejemplo 1D; Modelo de bucle de tubo de activación de complemento

Para ensayar la capacidad de aptámero anti-C5 para bloquear la activación de complemento inducida mediante exposición a materiales extraños, como se encuentra en un circuito de revascularización cardiopulmonar, se empleó el modelo de bucle de tubo descrito por Nilsson y colegas (Gong et al., (1996) Journal of Clinical Immunology 16, 222-9; Nilsson et al, (1998) Blood 92, 1661-7). Se cortó tubo quirúrgico/médico Tygon S-50-HL (diámetro interno de 0,635 cm) (United States Plastic Corp. ((Lima, OH), N° de Cat. 00542) en longitudes de aproximadamente 300 mm (aproximadamente 9 ml de volumen) y se rellenaron con 5 ml de sangre de donante humano que contenía 0,4 unidades/ml de heparina (Celsus) y diversas concentraciones de ARC658 (SEC ID N°: 62) (0 - 5 mM). Cada longitud de tubo Tygon se cerró en un bucle con secciones cortas (~50 mm) de tubo enlazante de silicona no quirúrgico (diámetro interno de 0,95 cm) (United States Plastic Corp. (formulación R-3603, N° de Cat. 00271) como se describe en Gong et al. Los bucles de tubo se rotaron durante 1 hora a aproximadamente 30 rpm en un baño de agua a 37 °C. Los contenidos del bucle se vertieron a continuación en tubos cónicos de polipropileno que contenían EDTA (concentración final de 10 mM) para inactivar la activación de complemento. Se aisló plasma pobre en plaquetas mediante centrifugación y se analizó para C5a y C3a mediante ELISA (kit ELISA de C3a, Quidel, San Diego, CA; kit ELISA C5a, BD Biosciences San Diego, CA).

La activación total de complemento en ausencia de aptámero fue pequeña en comparación al ensayo de zimosano. Normalmente, los niveles de C5a aumentaron en aproximadamente 6 nm/ml después de la incubación de 1 hora, correspondiente a la activación de < 1 % del C5 disponible. Sin embargo, este aumento fue reproducible y se inhibió mediante titulación con ARC658 (SEC ID N°: 62). Tal como se muestra en la Figura 17, 300 - 400 nM de ARC658 (SEC ID N°: 62) fueron suficientes para lograr un 99 % de inhibición de activación de C5, un nivel que es aproximadamente equivalente o ligeramente menor que la concentración molar de C5 en sangre. Aunque no se desea estar unidos a teoría alguna, aunque se necesita menos aptámero para obtener una inhibición del 99 % de la activación de C5 en este modelo que en el modelo de zimosano, esta observación puede reflejar las diferencias sustanciales en el estímulo activador de complemento usado en los dos ensayos. La generación de C3a también se controló como un control para verificar que ARC658 (SEC ID N°: 62) no bloqueaba las etapas de activación antes de C5 en la cascada de complemento. Los niveles de C3a aumentaron en aproximadamente 4000 ng/ml después de la incubación de 1 hora, correspondiente a la activación de aproximadamente el 10 % del C3 disponible. En comparación con la generación de C5a, se observó poca inhibición dependiente de la dosis de generación de C3a tras la titulación con ARC658 (SEC ID N°: 62) lo que demuestra que ARC658 (SEC ID N°: 62) bloquea específicamente la escisión de C5.

El estudio de modelo de bucle de tubo se repitió con el aptámero anti-C5 ARC1905 (SEC ID N°: 67). ARC1905 se diluyó en serie en suero salino al 0,9 % para generar una serie de muestras 20X que cubren un intervalo de 100 veces las concentraciones de aptámero (10 - 1000 nM finales en el ensayo). Las muestras que contenían aptámero irrelevante (ARC127) se incluyeron para controlar los efectos no específicos de oligonucleótidos. También se incluyó una muestra sin aptámero (solo salino) como control negativo. Se tomaron muestras de sangre de un solo donante mediante métodos estándar de flebotomía a partir de voluntarios internos. La sangre completa se recogió de 5 donantes individuales directamente en una jeringa de 60 ml (Becton-Dickinson, (Franklin Lakes, NJ), N° de Cat. 309653) y se alicuotaron en bivalirudina (final de 20 mM) (Prospec-Tany Technogene Ltd., (Israel), N° de lote 105BIV01) +/- aptámero. El anticoagulante bivalirudina, un inhibidor directo de trombina, se usó en vez de heparina que interfiere con la activación de complemento.

El modelo de bucle de tubo se efectuó esencialmente como se describe inmediatamente antes. Se rellenaron secciones de ~300 mm de tubo (diámetro 0,635 cm, volumen ~9 ml) con 5 ml de muestras de sangre/aptámero/bivalirudina inmediatamente después de que se recogiese la sangre del donante. Los tubos se cerraron de manera segura en bucles con secciones cortas (~50 mm) de tubo enlazante de silicona, produciendo un volumen de gas de ~4ml. Los bucles de tubo se rotaron verticalmente a 32 rpm durante la incubación en un baño de agua a 37 °C durante 1 hora. Después de la incubación, los 5 ml de muestra se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml (Corning, (Corning, NY), N° de Cat. 430766) que contienen 100 ml de EDTA 0,5 M, dando una concentración final de EDTA de 10 mM. Se recogió 1 ml de plasma sobrenadante de cada muestra inactivada después de la centrifugación (tubos Eppendorf de Centrifuga 5804) a 4 °C (3.300 rpm, 20 minutos). Los sobrenadantes se congelaron de manera ultrarrápida en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C. Para controlar la inactivación de fondo, se preparó una muestra pre-CPB añadiendo 5 ml de sangre fresca directamente a un tubo cónico de 15 ml sobre hielo que contenía 100 ml de EDTA 0,5 M. Esta muestra se procesó para plasma y se almacenó como se describe anteriormente.

El alcance de la activación de C5 se determinó a partir de los niveles relativos de C5a generados en cada muestra

- activada, medido mediante ELISA de C5a como se describe inmediatamente antes. El ELISA de C5a se efectuó con muestras de plasma sin diluir de acuerdo con el protocolo del kit de ELISA y se cuantificaron los niveles de C5a de la muestra mediante comparación con los patrones de C5a proporcionados por el fabricante. El % de inhibición de generación de C5a a cada concentración de aptámero se calculó usando la ecuación  $\%inh = 100 - 100 \times (C5a_{muestra} - C5a_{pre-CPB}) / (C5a_{solo\ muestra} - C5a_{pre-CPB})$ . Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron a partir de una representación del % de inhibición frente a [ARC1905] usando la ecuación  $\%inh = (\%inh)_{máximo} \times [ARC1905]^n / (CI_{50}^n + [ARC1905]^n) + fondo$ . Los valores de  $CI_{90}$  y  $CI_{99}$  se calcularon a partir de los valores de  $CI_{50}$  usando las ecuaciones  $CI_{90} = CI_{50} \times [90/(100-90)]^{1/n}$  y  $CI_{99} = CI_{50} \times [99/(100-99)]^{1/n}$ .
- El alcance de la activación de C3 se determinó a partir de los niveles relativos de C3a generados en cada muestra activada, medido mediante ELISA de C3a como se describe inmediatamente antes. Justo antes del análisis de C3a, se diluyeron en serie muestras (incluyendo los controles de solo salino y pre-CPB) en suero salino al 0,9 %. El ELISA de C3a es más sensible que aquel para C5a; por tanto, se necesitó una dilución de 1/5000 para acomodar el intervalo de concentraciones de muestra de C3a. Los niveles de C3a se cuantificaron mediante comparación con los patrones del kit, y el % de inhibición se calculó como se describe para C5a. Los datos se analizaron usando Microsoft Excel, y los valores medios de % de inhibición se representaron usando Kaleidagraph (v 3.5 Synergy Software). Los valores de  $CI_{50}$ ,  $CI_{90}$  y  $CI_{99}$  se determinaron usando el complemento XLfit 4.1 en Excel.
- Los efectos medios de ARC1905 y aptámero irrelevante ARC127, sobre la activación de complemento en los cinco donantes se resume en la Figura 66. Como se muestra en la Figura 67, el bloqueo completo de la activación de C5, como se refleja en la generación de C5a, se logró con <500 nM de ARC1905, mientras que el aptámero irrelevante no tuvo efecto inhibitorio hasta 1 mM. Los valores medios en sangre de  $CI_{50}$ ,  $CI_{90}$  y  $CI_{99}$  fueron  $119 \pm 28,6$  nM,  $268 \pm 39,2$  nM y  $694 \pm 241$  nM, respectivamente (Figura 66). Aunque no se desea estar unidos a teoría alguna, es razonable asumir que ARC1905 está excluido del volumen de sangre celular, que comprende aproximadamente el 45 % del total. Los valores de  $CI_{50}$ ,  $CI_{90}$  y  $CI_{99}$ , ajustados para reflejar la inhibición de C5 en plasma, por tanto, fueron  $216 \pm 52,0$  nM,  $487 \pm 71$  nM y  $1261 \pm 438$  nM. Estos valores son coherentes con los parámetros calculados para la inhibición de ARC1905 de activación de complemento inducida por zimosano en suero, lo que sugiere que los componentes celulares de la sangre no interfieren significativamente con la actividad anti-C5 de ARC1905. La generación de C3a no se inhibió por ARC1905 o aptámero irrelevante hasta 1 mM. Aunque no se desea estar unidos a teoría alguna, esto sugiere que ARC1905 no inhibe la reacción de convertasa de C3, ni bloquea otras etapas que contribuyen a la activación de la cascada alternativa, tal como la deposición de C3 y el ensamblaje de convertasa.

## EJEMPLO 2

### Selecciones y secuencias desde cero

#### Selección de C5 con grupo de dRmY

- Se efectuaron dos selecciones para identificar aptámeros de dRmY para proteína C5 humana de longitud completa. La proteína C5 (Quidel Corporation, San Diego, CA o Advanced Research Technologies, San Diego, CA) se usó en forma de longitud completa ("LC") y parcialmente tripsinizada ("ATP") y ambas selecciones fueron selecciones directas contra las dianas proteicas que se habían inmovilizado sobre una placa hidrófoba. Ambas selecciones produjeron grupos significativamente enriquecidos para unión a C5 de longitud completa frente a grupo sin tratar no seleccionado. Todas las secuencias mostradas en este ejemplo se muestran en 5' a 3'.

**Preparación del grupo:** Un molde de ADN con la secuencia

- TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTACN<sub>(30)</sub>GGTCGATC GATCGATCATCGATG  
 (ARC520; SEC ID N°: 70) se sintetizó usando un sintetizador de ADN ABI EXPEDITE™, y se desprotegió mediante métodos estándar. Los moldes se amplificaron con cebador 5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC (SEC ID N°: 71) y cebador 3' CATCGATGATCGATCGATCGACC (SEC ID N°: 72) y después se usaron como plantilla para transcripción *in vitro* con ARN polimerasa T7 mutante simple Y639F. Las transcripciones se efectuaron usando HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, TritonX-100 al 0,01 %, PEG-8000 al 10%, MgCl<sub>2</sub> 9,5 mM, MnCl<sub>2</sub> 2,9 mM, NTP 2 mM, GMP 2 mM, espermina 2 mM, pirofosfatasa inorgánica 0,01 unidades/μl, y polimerasa T7 mutante simple Y639F.

- Selección: En el ciclo 1, se efectuó una etapa de selección positiva sobre columnas de unión de filtro de nitrocelulosa. Brevemente, se incubaron  $1 \times 10^{15}$  moléculas (0,5 nmol) de agrupación de ARN en 100 μl de tampón de unión (DPBS 1X) con 3 μM de C5 de longitud completa o 2,6 μM de C5 parcialmente tripsinizada durante 1 hora a temperatura ambiente. Se separaron complejos ARN:proteína y moléculas de ARN libres usando 0,45 μm de columnas de centrifugación de nitrocelulosa de Schleicher & Schuell (Keene, NH). Las columnas se prelavaron con 1 ml de DPBS 1X, y después las soluciones que contenían ARN:proteína se añadieron a las columnas y se centrifugaron a 1500 g durante 2 minutos. Se efectuaron tres lavados con 1 ml de tampón para eliminar los aglutinantes no específicos de los filtros, después, los complejos ARN:proteína unidos a los filtros se eluyeron dos veces con lavados de 200 ml de tampón de elución (urea 7 M, acetato de sodio 100 mM, EDTA 3 mM, precalentado a 95 °C). El ARN eluido se precipitó (glucógeno 2 μl, isopropanol 1 volumen, etanol ½ volumen). Se retrotranscribió

el ARN con el sistema ThermoScript RT-PCR™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando el cebador 3' descrito anteriormente SEC ID N°: 72, seguido de amplificación mediante PCR (Tris 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, cebadores 0,5 μM SEC ID N°: 71 y SEC ID N°: 72, dNTP 0,5 mM cada uno, 0,05 unidades/ml de polimerasa Taq (New England Biolabs, Beverly, MA)). Los moldes de PCR se purificaron usando columnas Centriprep (Princeton Separations, Princeton, NJ) y se usaron para transcribir el grupo del ciclo siguiente.

En ciclos posteriores de selección, la separación de ARN unido y libre se efectuó sobre placas hidrófobas Nunc Maxisorp (Nunc, Rochester, NY). El ciclo se inició inmovilizando 20 pmol de la C5 de longitud completa y C5 parcialmente tripsinizada a la superficie de la placa durante 1 hora a temperatura ambiente en 100 μl de DPBS 1X. El sobrenadante se retiró a continuación y los pocillos se lavaron 4 veces con 120 μl de tampón de lavado (DPBS 1X). Los pocillos de proteína se bloquearon a continuación con un tampón DPBS 1X que contiene 0,1 mg/ml de ARN de levadura y 0,1 mg/ml de ADN de esperma de salmón como competidores. La concentración del grupo usada siempre estaba siempre en un exceso de al menos cinco veces el de la concentración de proteína. El grupo de ARN también se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en pocillos vacíos para eliminar cualquier secuencia unida a plástico, y después se incubaron en un pocillo bloqueado sin proteína para eliminar cualquier secuencia de unión a competidor a partir del grupo antes de la etapa de selección positiva. El grupo de ARN se incubó a continuación durante 1 hora a temperatura ambiente y el ARN unido a la C5 inmovilizada se retrotranscribió directamente en la placa de selección mediante la adición de mezcla RT (cebador 3', SEC ID N°: 72 y ThermoScript RT, Invitrogen) seguido de incubación a 65 °C durante 1 hora. El ADNc resultante se usó como molde para la PCR (polimerasa Taq, New England Biolabs). El grupo de ADN molde amplificado se desaló con una columna Centriprep (Princeton Separations) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante y se usaron para programar la transcripción del grupo de ARN durante el siguiente ciclo de selección. El grupo transcrito se purificó en gen sobre un gel de poliacrilamida al 10 % en cada ciclo.

El proceso de selección se controló usando un ensayo de unión en filtro en sándwich (transferencia puntual). El grupo de ARN marcado en 5' con <sup>32</sup>P-la (concentración traza) se incubó con C5, DPBS 1X más ARNt 0,1 mg/ml y ADN de esperma de salmón 0,1 mg/ml durante 30 minutos a temperatura ambiente, y después se aplicó a un sándwich de filtro de nitrocelulosa y nylon en un aparato de transferencia puntual (Scheicher & Schuell). El porcentaje de grupo de ARN unido a la nitrocelulosa se calculó y controló aproximadamente cada 3 ciclos con una pantalla de un solo punto (+/- 300 nM de C5). Las medidas de K<sub>d</sub> del grupo se midieron usando una titulación de proteína y el aparato de transferencia puntual como se describe anteriormente.

**Datos de selección:** Ambas selecciones se enriquecieron después de 10 ciclos frente al grupo no expuesto. Véase Figura 18. En el ciclo 10, la K<sub>d</sub> del grupo fue aproximadamente 115 nM para longitud completa y 150 nM para la selección tripsinizada, pero el alcance de la unión fue solo aproximadamente el 10 % en la fase estable en ambos. Los grupos de R10 se clonaron usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) y se secuenciaron.

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

La secuencia individual listada en la Tabla 3 está listada en la dirección 5' a 3', y representa la secuencia de ribonucleótidos del aptámero que se selección en las condiciones de SELEX de dRmY proporcionadas. En las realizaciones de la invención derivadas de esta selección (y reflejadas en el listado de secuencias) las purinas (A y G) son desoxi y las pirimidinas (U y C) son 2'-OMe. La secuencia listada en la Tabla 3 puede o no contener taponado (por ejemplo, una dT 3' invertida). La secuencia única del aptámero a continuación comienza en el nucleótido 23, siguiendo inmediatamente la secuencia fija GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEC ID N°: 73), u ciclos hasta que alcanza la secuencia de ácidos nucleicos 3' fija GGUCGAUCGAUCGAUCAUCAUG (SEC ID N°: 74)

Tabla 3: Secuencia de nucleótidos del aptámero dRmY de C5

ARC913 (SEC ID N°: 75)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCAUG

**Ensayo de hemólisis:** El efecto de ARC913 (SEC ID N°: 75) sobre la vía clásica del sistema de complemento se analizó usando un ensayo de hemólisis descrito anteriormente, en comparación con tanto ARC186 (SEC ID N°: 4) (aptámero anti-C5, control positivo) y grupo de dRmY no seleccionado (control negativo). En el ensayo de inhibición hemolítica, se mezcló una solución de suero humano completo al 0,2 % con eritrocitos de oveja recubiertos de anticuerpo (Prueba Diamedix EZ Complement CH50, Diamedix Corporation, Miami, FL) en presencia de ARC913 titulado (SEC ID N°: 75). El ensayo se efectuó en salino tamponado con veronal que contenía calcio, magnesio y gelatina al 1 % (tampón de complemento GVB++) y se incubaron durante 1 hora a 25 °C. Después de la incubación se centrifugaron las muestras. Se leyó la densidad óptica a 415 nm (DO<sub>415</sub>) del sobrenadante. La inhibición de la

actividad de hemólisis se expresa como % de actividad de hemólisis en comparación con el control. Véase la Figura 20. La  $CI_{50}$  del aptámero se calculó como aproximadamente 30 nM.

### **EJEMPLO 3**

5

#### **Composición y optimización de secuencia**

##### Ejemplo 3A: Minimización de ARC913:

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

15 Las secuencias individuales listadas en la Tabla 4 se listan en la dirección 5' a 3' y se derivaron de aptámeros que se seleccionaron en las condiciones de SELEX de dRmY proporcionadas. En las realizaciones de la invención derivadas de esta selección (y reflejadas en el listado de secuencias) las purinas (A y G) son desoxi y las pirimidinas (U y C) son 2'-OMe. Cada una de las secuencias listadas en la Tabla 5 pueden o no contener un tapón (por ejemplo, una dT invertida 3').

**Tabla 4.** Secuencias de nucleótidos de clones minimizados de ARC913

**ARC874 (SEC ID N°: 76)**

CCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGG

**ARC875 (SEC ID N°: 77)**

CCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAAACGCAGGG

**ARC876 (SEC ID N°: 78)**

GGGUUUGGCACAGGCAUACAUACCC

**ARC877 (SEC ID N°: 79)**

GGGUUUGGCACAGGCAUACAAACCC

**ARC878 (SEC ID N°: 80)**

GGCGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGCC

**ARC954 (SEC ID N°: 81)**

CGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGAUCG

20

##### Ejemplo 3B: Optimización de ARC913: Reselección dopada

25 Tanto para optimizar el clon ARC913 (SEC ID N°: 75) para la afinidad de unión a C5, y para determinar los elementos clave de unión, se efectuó una reelección dopada. Las reelecciones dopadas se usan para explorar las necesidades de secuencia dentro de un clon activo o mínimo. Las selecciones se llevan a cabo con un grupo sintético, degenerado que se ha diseñado basándose en una sola secuencia. El nivel de degeneración varía generalmente desde un 70 % hasta un 85 % del nucleótido de tipo silvestre. Por lo general, se observan mutaciones neutras, pero en algunos casos, los cambios de secuencia pueden dar como resultado mejoras en la afinidad. La información de secuencia compuesta puede usarse entonces para identificar el motivo mínimo de unión y ayudar a los esfuerzos de optimización.

30

**Preparación del grupo:** La secuencia molde taatagactactataGGGAGAGGAGAGAACGTTCTACN<sub>(30)</sub>GTTACGACTAGCATCGATG (SEC ID N°: 82) se basó en ARC913 (SEC ID N°: 75) y se sintetizó con cada resto originándose de la región al azar dopada a un nivel del 15 %, es decir, en cada posición ("N") al azar, el resto tiene un 85 % de posibilidades de ser el nucleótido encontrado en la secuencia de tipo silvestre CTTGGTTTGGCACAGGCATACATACGCAGGGTTCGATCG (SEC ID N°: 83) y una probabilidad del 15 % uno de los otros tres nucleótidos.

35

40 El molde y el grupo de ARN para la reelección dopada se prepararon esencialmente como se describe anteriormente. Los moldes se amplificaron con los cebadores taatagactactataGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC (SEC ID N°: 84) y CATCGATGCTAGTCGTAAC (SEC ID N°: 85). Se efectuaron dos selecciones con la C5 de longitud completa, una selección usando una concentración mayor de sal en la etapa de lavado. El protocolo de selección se llevó a cabo como se describe anteriormente, con dos excepciones: 1) El ciclo 1 se efectuó en placas hidrófobas (así como en ciclos posteriores) con solo una etapa positiva; y 2) no se usó competidor durante la selección. La concentración de C5 y la concentración del grupo de ARN se mantuvieron constantes a 200 nM y 1 uM respectivamente.

45

**Datos de reelección dopada:** Las selecciones normales y altas en sal se enriquecieron después de 5 ciclos frente al grupo no expuesto. En la ronda 5, la  $K_d$  del grupo fue aproximadamente 165 nM para la selección alta en sal y 175



- nM para la selección normal en sal. El alcance de la unión fue aproximadamente un 20 % en la fase estable de ambos. Los grupos de R4 se clonaron usando kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA). y se secuenciaron 48 clones de cada grupo. Se transcribieron 12 clones de cada grupo y se ensayaron en un ensayo de transferencia monopunto a 500 nM de C5. Las constantes de disociación ( $K_d$ ) se midieron de nuevo usando el ensayo de transferencia puntual descrito anteriormente. Las  $K_d$  se estimaron para los 11 mejores clones identificados en la pantalla monopunto, ajustando los datos a la ecuación: fracción de ARN unido =  $\text{amplitud} * K_d / (K_d + [C5])$ . Los clones con las tres mejores  $K_d$  fueron SEC ID N°: 91 (73 nM), SEC ID N°: 96 (84 nM) y SEC ID N°: 95 (92 nM). Las secuencias para estos 11 clones se listan a continuación en la Tabla 5.
- 10 Las secuencias listadas en la Tabla 5 se listan en la dirección 5' a 3' y representan las secuencias de nucleótidos de los aptámeros que se seleccionaron en las condiciones de SELES de dRmY proporcionadas. En las realizaciones de la invención derivadas de esta selección (y reflejadas en el listado de secuencias), las secuencias correspondientes que comprenden las combinaciones de restos de dRmY, como se indican 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 listadas en la Tabla 5 pueden o no
- 15 contener taponado (por ejemplo, una dT invertida 3'). Las secuencias únicas de cada aptámero a continuación comienza en el nucleótido 23, siguiendo inmediatamente la secuencia fija 5' GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEC ID N°: 86), y ciclos hasta que alcanza la secuencia de ácidos nucleicos fija 3' GU- UACGACUAGCAUCGAUG (SEC ID N°: 87).

**Tabla 5.** Secuencias de nucleótidos de clones de selección dopada

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>(SEC ID N°: 88)</b> | GGGAGAGGAGAGAACGGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACCAUACCGCAGGGGUCGAUCGGUJACGACUAGCAUCGGAUG |
| <b>(SEC ID N°: 89)</b> | GGGAGAGGAGAGAACGGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACCAUACCGCAGGGUUCGAUCUGUJACGACUAGCAUCGGAUG |
| <b>(SEC ID N°: 90)</b> | GGGAGAGGAGAGAACGGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUAAAUACCGCAGGGCUCGAUCGGUJACGACUAGCAUCGGAUG  |
| <b>(SEC ID N°: 91)</b> | GGGAGAGGAGAGAACGGUUCUACCUUGGUUUGGCCCCAGGCAUUAUACCGCAGGGAUUGAUCGGUJACGACUAGCAUCGGAUG  |
| <b>(SEC ID N°: 92)</b> | GGGAGAGGAGAGAACGGWCUACCUUGGUWGGCCGAGGCAUACAUACCGCAGGGUUCGAUCGGUJACGACUAGCAUCGGAUG    |
| <b>(SEC ID N°: 93)</b> | GGGAGAGGAGAGAACGGUUCUACCUUGGUUGGCACAGCCAAACCCUACGCACGGAUJCGCCCCGGUJACGACUAGCAUCGGAUG |
| <b>(SEC ID N°: 94)</b> | GGGACYAGGAGAGAACGGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACCGCAGGUCGAUCGGUJACGACUA             |
| <b>(SEC ID N°: 95)</b> | GGGAGAGGAGAGAACGGUUCUACCUUAGGUJCGCACUGUCAUACAUACACACGGGCAUJCGUJACGACUAGCAUCGGAUG     |
| <b>(SEC ID N°: 96)</b> | GGGAGAGGAGAGAACGGUUCUACCUUGGUUUGGCNAGGCAUANAUAACGCACGGGUCGAUCGGUJACGACUAGCAU         |
| <b>(SEC ID N°: 97)</b> | GGGAGAGGAGAGAACGGUUCUACCUUUCUCUGCCACAAGCAUACCUJCGGGGGUUCUUAUUGGUJACGACUAGCAUCGGAUG   |
| <b>(SEC ID N°: 98)</b> | GGGAGAGGAGAGAACGGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUUAUACCGCAGGGUUCGAUCCCCUJACGACUAGCAUCGGAUG  |

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

El oligonucleótido 5' NH<sub>2</sub>-fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGf CmG-3T -3' (ARC672, SEC ID N°: 63) se sintetizó en un sintetizador de ADN Expedite (ABI, Foster City, CA) de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante usando ARN 2'-OMe estándar comercialmente disponible y ARN 2'-F y fosforamiditas de ARN protegido con TBDMS (Glen Research, Sterling, VA) y un soporte de CPG de desoxitimidina invertida. La función amino terminal se unió con un modificador 5'-amino, 6-(trifluoroacetilamino)hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita, C6-TFA (Glen Research, Sterling, VA). Después de la desprotección, los oligonucleótidos se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico sobre resina Super Q 5PW (30) (Tosoh Biosciences) y se precipitaron con etanol.

El aptámero modificado con amina se conjugó a diferentes restos PEG de manera post sintética. El aptámero se disolvió en una solución de agua/DMSO (1:1) a una concentración entre 1,5 y 3 mM. pH 8,5, Se añadió tampón de carbonato de sodio, pH 8,5, a una concentración final de 100 mM, y se hizo reaccionar el oligo durante toda la noche con un exceso molar de 1,7 del reactivo de PEG deseado (por ejemplo, ARC1905 de 40 kDa, Sunbright GL2-400NP éster de carbonato de p-nitrofenilo [NOF Corp, Japón], o ARC187 de 40 kDa éster de mPEG2-NHS [Nektar, Huntsville AL]) disuelto en un volumen igual 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 en fase reversa efectuada sobre resina Amberchrom CG300-S (Rohm and Haas), y se liofilizaron. La estructura de ARC187 (SEC ID N°: 5) se muestra en la Figura 21 mientras que la estructura de ARC1905 (SEC ID N°: 67) se muestra en la Figura 22.

**EJEMPLO 4****Modelo de corazón perfusionado aislado**Ejemplo 4A: Prueba de principio con ARC186

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

Este modelo se usó para establecer que el aptámero bloqueante de C5 ARC186 (SEC ID N°: 4), al igual que Pexelizumab, inhibió el daño de complemento mediado por C5 a corazones de ratón perfusionados aislados. Se compraron ratones C57BL/6 a través de Charles River Laboratories, (Wilmington, MA). Brevemente, después de la inducción de anestesia profunda, se extrajo el corazón de cada ratón y se montó sobre una aguja roma insertada dentro de la aorta, a través de la cual el corazón se perfusionó de manera continua con tampón de Krebs Heinsleit. Se insertó un transductor de presión (Mouse Specifics, Boston, MA) en el ventrículo izquierdo permitiendo una medida continua del ritmo cardíaco y presión intraventricular. Después de un período de 15 minutos de equilibrio durante los cuales se tomaron las medidas iniciales, los corazones se perfusionaron a continuación con tampón y plasma humano al 6 % +/- aptámero a varias concentraciones (véase la Figura 23). Durante estos estudios y como se describe en Evans et al., se demostró que los corazones que se perfusionaron con tampón de Krebs Heinsleit + plasma humano al 6 % experimentaron fallo tras 5 minutos de la adición de plasma al perfusionado, mientras que los corazones que se perfusionaron de manera continua con tampón solamente continuaron latiendo en un exceso de dos horas. De este modo, la duración de cada experimento se definió de manera arbitraria como 15 minutos. Los rasgos generales de este estudio con ARC186 se presentan en la Figura 23.

Se controló y registró la presión intraventricular de manera continua dando como resultado un trazado de una onda de presión (Figuras 24 y 25). El punto de deflexión más bajo representa la presión diastólica final ("EDP") y el punto máximo de deflexión representa la presión sistólica ("SP"). Las ondas de presión iniciales aparecen a la derecha de la línea vertical marcada con "0" mostrada en cada trazado. Como se ha publicado anteriormente (Evans et al., 1995), los corazones perfusionados con plasma humano al 6% experimentaron un rápido aumento en la presión ventricular izquierda y diastólica final, culminando en último lugar en asístole (el corazón se detiene) a los 5 minutos (Figura 24). Cuando se añadió aptámero irrelevante al plasma humano a un exceso molar de 50 veces, también se observaron EDP aumentada y asístole (Figura 24).

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

experimento. Cuando se añadió ARC186 al plasma en un exceso molar de 10 veces o 50 veces (Figura 25), las ondas de presión ventricular permanecieron normales y no se observó asístole. Además, no fue evidente el edema y turgencia anteriormente descritos en estos grupos.

5 Durante cada experimento, se registró el ritmo cardíaco a intervalos de 5 minutos, y se representó gráficamente el ritmo cardíaco medio para el grupo durante cada intervalo. Como se muestra en la Figura 26, los corazones perfusionados sin aptámero o con aptámero irrelevante desarrollaron asístole rápidamente, generalmente en 5 minutos. ARC186 añadido al sistema a equivalencia molar retrasó levemente la aparición de asístole. Sin embargo, los corazones en este grupo fallaron finalmente. ARC186 añadido al plasma a un exceso molar de 10 veces o 50  
10 veces preservó el ritmo cardíaco durante la duración de cada experimento.

El aumento porcentual en el peso cardíaco frente al inicial se calculó a partir de una muestra representativa de corazones fallidos (sin aptámero o exceso molar de 50 veces de aptámero irrelevante) y se compararon con los corazones protegidos por ARC186 (exceso molar de 10 veces y 50 veces de ARC186). Tal como se muestra en la  
15 Figura 27, los corazones protegidos con ARC186 ganaron significativamente menos peso que los corazones fallidos en los grupos de control.

Ya que ARC186 inhibe la escisión de C5 pero no la de C3, los productos de escisión de C3 (C3a) pero no los de escisión de C5 (C5a o C5b) deben encontrarse en el efluente que fluye desde los corazones aislados protegidos por  
20 ARC186. Para mostrar directamente que ARC186 inhibió la escisión de C5 en plasma humano, los niveles relativos de proteínas de complemento humana C5a y C5b (productos de escisión de C5) y C3a (un producto de escisión de C3) se midieron en el efluente de tampón a partir de los varios grupos mediante kit de ELISA comercialmente disponibles (kit ELISA C5b-9, Quidel, San Diego, CA; kit de ELISA de 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  
25 manera dependiente de la dosis. Por el contrario, ARC no tuvo efecto sobre la escisión de C3 humano en C3a y C3b (Figura 30) demostrando adicionalmente la especificada sobre C5 de la molécula.

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

35 Como se describe en este estudio, el aptámero bloqueante de C5 ARC186 se ensayó en un modelo *ex vivo* de daño de tejido mediado por componente de complemento C5 que usa corazones de ratón aislados perfusionados con tampón de Krebs Heineleit y plasma humano heparinizado al 6%, basándose en un modelo descrito en un estudio publicado anteriormente que probó los efectos del anticuerpo anti-C5, Pexelizumab sobre el sistema de  
40 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 en plasma humano (pero no C3), (b) inhibió la deposición de C5b humano (pero no C3b) en el tejido cardíaco de ratón y (c) inhibió la disfunción miocárdica mediada por C5b-9 a concentraciones clínicamente relevantes (5 mM, un exceso molar de 10 veces de aptámeros frente a C5). Estos datos muestran que cuando se activa la cascada de complemento humana de modo fisiológicamente relevante, los aptámeros de bloqueo de C5 son capaces de inhibir la escisión de C5 en plasma y prevenir el daño miocárdico y la  
45 disfunción.

#### Ejemplo 4B: Eficacia de aptámero PEGilado

50 Los materiales y métodos usados en este estudio fueron exactamente los mismos a los descritos en el Ejemplo 4A anterior. El diseño experimental y los resultados se representan en la Figura 32. La primera mitad del experimento usó plasma humano heparinizado (Center for Blood Research, Harvard Medical School, Boston, MA) como fuente de complemento y la segunda mitad usó plasma de macaco cinomolgo heparinizado (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) como fuente de complemento. Se añadió un aptámero PEGilado (ARC658; SEC ID N°: 62) al sistema a relaciones molares en aumento. Aunque se recogieron todas las representaciones de presión ventricular relevantes, la tabla lista la presencia o ausencia de un aumento en la presión diastólica final (EDP), independientemente de si hubo asístole y el tiempo hasta el fallo cardíaco (definido como la presencia de una EDP elevada y asístole).

60 Durante los experimentos con plasma humano, la dosis óptima de ARC658 (SEC ID N°: 62) se determinó por la equivalencia molar (500 nM) mientras que durante los experimentos con plasma de primate no humano, fue necesario un exceso molar de 50 veces (25 mM) para proteger al corazón del daño mediado por C5b (véase la Figura 32).

65 Estos datos son coherentes con la diferencia en la afinidad del aptámero anti-C5 por C5 de humano frente a primate indicada por los datos *in vitro*. Aunque no se desea estar unidos a teoría alguna, durante los estudios de FC/FD posteriores en macaco cinomolgo descritos en el Ejemplo 5, se demostró adicionalmente que un exceso molar de 30

veces de aptámero fue necesario para inhibir la escisión de C5 en plasma mediada por zimosano, apoyando adicionalmente la noción de que el aptámero se une a C5 de primate con menor afinidad que a C5 de humano.

De manera colectiva, estos estudios indican que tanto los aptámeros de bloqueo a C5 ARC186 (SEC ID N°: 4) y a un alcance mayor ARC658 (SEC ID N°: 62) son eficaces en el modelo de corazón de ratón perfusionado aislado. Este modelo también demostró que tuvo que usarse significativamente más ARC658 (SEC ID N°: 62) para inhibir el daño cardíaco mediado por C5 de plasma de macaco cinomolgo (exceso molar 30 +), en comparación con el daño cardíaco mediado por C5 de humano (equivalencia molar), apoyando adicionalmente los datos *in vitro* que indicaron que el aptámero tenía menor afinidad por C5 de primate. Finalmente, estos datos indicaron que los macacos cinomolgo podrían necesitar dosificarse más allá de un exceso molar de 30 veces para demostrar el bloqueo de C5 durante los estudios de FC/FD.

## **EJEMPLO 5**

### **METABOLISMO Y FARMACOCINÉTICA DEL FÁRMACO DE APTÁMEROS ANTI-C5 EN ANIMALES**

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

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

El precursor de los aptámeros de oligonucleótido no PEGilado (es decir, ARC 186; SEC ID N°: 4) se ensayó en plasma de rata y macaco cinomolgo (Charles River Labs, Wilmington, MA) para determinar su estabilidad, cinética de velocidad, y vías de degradación. Las pruebas se efectuaron aptámero radiomarcado en el extremo 5' (<sup>32</sup>P) incubado a 37 °C en plasma agrupado al 95 % (citrado) durante el trascurso de 50 horas. En puntos temporales seleccionados, se recogieron alícuotas de plasma que contenía aptámero, se congelaron de manera ultrarrápida inmediatamente en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80 °C. La detección y análisis del aptámero y sus metabolitos en plasma se efectuó usando extracción líquido-líquido (fenol-cloroformo) seguido de electroforesis en gel (en un gel de secuenciación de poliacrilamida desnaturalizante al 10 %) y autorradiografía de alta resolución.

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

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

Para determinar el perfil farmacocinético de ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 63) y ARC187 (SEC ID N°: 5), y para estimar el nivel de dosificación necesario y frecuencia en primates y humanos, se efectuó un estudio farmacocinético en ratas Sprague-Dawley cateterizadas (Charles River Labs, Wilmington, MA). Los aptámeros se formularon para inyección a 10 mg/ml (peso de oligo) en suero salino estándar y esterilizados por filtración (0,2  $\mu\text{m}$ ) en un vial de dosificación pre-esterilizado usando condiciones asépticas. La vía de administración usada para el estudio en rata fue un bolo intravenoso a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. Los brazos del estudio consistieron en 3 animales por grupo, a partir de los cuales se tomaron sangrados en serie antes de la dosis y a puntos temporales especificados durante el trascurso de 48 horas. El diseño del estudio se expone de manera general en la Figura 34. Se obtuvieron muestras de sangre a partir de los catéteres en la vena yugular implantados quirúrgicamente, se transfirieron directamente a tubos recubiertos con EDTA, se mezclaron mediante inversión, y se colocaron sobre hielo hasta el procesamiento para plasma.

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

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

Como se anticipó, el aptámero de 40 kDa ARC187 (SEC ID N°: 5) tuvo la mayor semivida y el aptámero de 20 kDa, ARC657 (SEC ID N°: 61), la más corta. La  $V_{ss}$  observada en relación al volumen conocido en plasma (~40 ml/kg) sugirió un grado moderado de unión/secuestro de ARC187 (SEC ID N°: 5) a proteínas y/o matriz de tejido en el espacio extravascular. Asumiendo una necesidad de mantener un exceso molar de 5 veces de aptámero, los resultados de este estudio sugirieron que ARC187 (SEC ID N°: 5) proporciona una ventaja significativa en cuanto a la frecuencia de dosificación y cantidad total de aptámero necesitada para mantener los niveles deseados en plasma.

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

#### Ejemplos 5C: Farmacocinética de ARC187 y ARC1905 en el ratón después de administración intravenosa

Para determinar el perfil farmacocinético de la estructura de ARC186 (SEC ID N°: 4) conjugada a un PEG ramificado diferente de 40 kDa que aquel de ARC187 (SEC ID N°: 5), se efectuó un estudio farmacocinético en ratones CD-1 hembra (obtenidos a través de Charles River Labs, Wilmington, MA). Los aptámeros se formularon para inyección a 2,5 mg/ml (peso de oligo) en suero salino estándar y esterilizados por filtración (0,2  $\mu$ m) en un vial de dosificación pre-esterilizado usando condiciones asépticas. La vía de administración usada para el estudio en ratón fue un bolo intravenoso a través de la vena de la cola a una dosis de 10 mg/kg. Los brazos del estudio consistieron en 3 animales por grupo, a partir de los cuales se tomaron sangrados pre-dosis (es decir, el grupo de control no dosificado) y a puntos de tiempo específicos a lo largo de 72 horas. El diseño del estudio se expone de manera general en la Figura 38A.

Se obtuvieron muestras de sangre mediante punción cardíaca terminal, se transfirieron directamente a tubos recubiertos con EDTA, se mezclaron mediante inversión, y se colocaron sobre hielo hasta el procesamiento para plasma. El plasma se recogió mediante centrifugación de tubos de sangre-EDTA a 5000 rpm durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante (plasma) a un tubo fresco premarcado. 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 efectuó usando un formato de ensayo homogéneo utilizando la adición directa de alícuotas de plasma para ensayar pocillos que contenían el reactivo de detección de ácidos nucleicos fluorescentes comercialmente disponible Oligreen™ (Molecular Probes, Eugene, OR). Después de un tiempo breve de incubación (5 minutos) a temperatura ambiente, protegidos de la luz, las placas de ensayo se leyeron mediante un lector de placas de fluorescencia (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La señal fluorescente de cada pocillo fue proporcional a la concentración de aptámero en el pocillo, y las concentraciones de muestra se calcularon mediante interpolación de valores de fluorescencia a partir de la curva patrón de fluorescencia-concentración (valores medios de curvas por duplicado o triplicado). Las concentraciones medias en plasma se obtuvieron en cada punto de tiempo a partir de los tres animales en cada grupo. Los datos de concentración en plasma frente al tiempo se sometieron a análisis no compartimental (NCA) usando el programa de modelado farmacocinético estándar de la industria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Se obtuvieron estimaciones para los siguientes parámetros farmacocinéticos principales; concentración máxima en plasma,  $C_{máx}$ , área bajo la curva de concentración-tiempo, ABC; semivida terminal,  $t_{1/2}$ ; eliminación terminal, CI, y volumen de distribución en estado estacionario,  $V_{ss}$ . Los datos de concentración media en plasma frente al tiempo se representan en la Figura 38B.

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

Se analizaron las mismas muestras de plasma para ARC187 y 1905 usadas para el análisis oligreen descrito inmediatamente antes usando un ensayo validado de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detección UV.

Los valores de concentración media en plasma para ARC187 y ARC1905 se calcularon usando Microsoft Excel 2003. Cuando los valores de concentración en plasma fueron menores del LIDC del ensayo bioanalítico antes de la dosis (tiempo 0), se asignó un valor de cero. Los valores por debajo del LIDC de las muestras tomadas después de la dosis se omitieron de los cálculos de concentración media en plasma. Los datos de concentración media en plasma se usaron en un análisis de FC independiente de modelo usando WinNonLin, Versión 5.1 (Pharsight Corporation, Mountainview, CA). El área bajo la curva de concentración de plasma-tiempo ( $ABC_{0-última}$ ) se estimó usando la regla trapezoidal lineal. Para los cálculos, cualquier valor que estuviese por debajo del LIDC del ensayo, excepto la muestra antes de la dosis, se excluyó de los cálculos para las estimaciones del parámetro FC. La semivida terminal aparente se calculó usando la fórmula  $t_{1/2} = 0,693/\lambda_z$  donde  $\lambda_z$  es la constante de velocidad de eliminación estimada a partir de la regresión de la pendiente terminal de la curva de concentración frente al tiempo. Se usaron al menos tres valores de concentración de plasma después del pico de concentración en la fase terminal

para determinar  $\lambda_z$  y se necesitó que el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) fuese  $\geq 0,85$ .

En general, el análisis mediante HPLC confirma el análisis de oligreen descrito inmediatamente antes, lo que demuestra que se descubrió que ARC1905 y ARC187 eran bioequivalentes, basándose en las comparaciones de las  $C_{m\acute{a}x}$  medias. Estimaciones del parámetro  $ABC_{0-ultima}$  y  $ABC_{0-\infty}$ . Las diferencias en  $ABC_{0-ultima}$  y  $ABC_{0-\infty}$ , valores para ARC1905 en relación a ARC187 (medidos mediante HPLC) se encontraban dentro de los criterios de aceptabilidad de  $\pm 20 \%$ .

Ejemplo 5D: Estudio de captación por tejidos de los inhibidores de C5 ARC657, ARC658 y ARC187 en el ratón después de administración intravenosa de bolo

Se obtuvieron ratones CD-1 hembra a través de Charles River Labs (Wilmington, MA). La formulación de ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 63) y ARC187 (SEC ID N°: 5) para inyección fue en salino a 5 mg/ml. Las formulaciones de dosificación se esterilizaron por filtración (0,2  $\mu$ m) en viales de dosificación previamente esterilizados en condiciones asépticas y se le dio a los animales un bolo intravenoso a través de la vena de la cola a una dosis de 25 mg/kg. El estudio consistió en grupos de 3 animales para cada uno de los cuatro puntos temporales,  $t =$  antes de la dosis, 3, 6, 12 horas. Después de la exsanguinación, se aclaró la vasculatura de cada animal de manera extensiva ( $V \sim 30$  ml) con suero salino para eliminar cualquier resto de sangre en la vasculatura. Los tejidos (corazón, hígado, riñón) se recogieron, pesaron, después se homogeneizaron al 50 % p/v en suero salino estándar, y se almacenaron a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta el momento del análisis.

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

Ejemplo 5E: Farmacocinética y farmacodinámica de los inhibidores de C5 ARC657, ARC658 y ARC187 en el macaco cinomolgo después del estudio 1 de administración intravenosa

La formulación de ARC657 (SEC ID N°: 61), ARC658 (SEC ID N°: 63) y ARC187 (SEC ID N°: 5) para inyección fue en suero salino estándar a 10 mg/ml y las formulaciones de dosificación se esterilizaron por filtración (0,2  $\mu$ m) en viales de dosificación pre-esterilizados en condiciones asépticas. La vía de administración usada para el estudio en macaco fue un bolo intravenoso a través de un catéter implantado quirúrgicamente en la vena femoral a una dosis de 30 mg/kg (exceso molar de aproximadamente 50 veces). El diseño del estudio se expone de manera general en la Figura 40. Se obtuvieron muestras de sangres a través de los catéteres de la vena femoral, se transfirieron directamente a tubos recubiertos con citrato de sodio, se mezclaron mediante inversión, y se colocaron sobre hielo hasta que se centrifugaron para separar el plasma (3000 rpm durante 5 minutos). El plasma se dividió entonces en alícuotas de 250  $\mu$ l que se almacenaron a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  y una alícuota de cada muestra se evaluó para concentración de aptámero usando el ensayo Oligreen™ basado en fluorescencia anteriormente descrito en la sección de FC de rata anterior.

Los datos primarios de concentración en plasma frente al tiempo se presentan en forma de tabla en la Figura 41. Como se anticipó, el aptámero de PEG de 40 kDa de ARC187 (SEC ID N°: 5) persistió en plasma durante el máximo periodo de tiempo mientras que el aptámero de PEG de 20 kDa de ARC657 (SEC ID N°: 61) persistió durante el menor espacio de tiempo. La inspección de los datos mostrados en la Figura 41 sugirió que los datos podrían ajustarse mejor a un modelo de dos compartimentos. Por tanto, las estimaciones de parámetro farmacocinético comunicadas en la Figura 42 se derivaron del modelo de dos compartimentos usando el programa de modelado farmacocinético estándar de la industria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

Como se muestra en la Figura 42, todos los aptámeros tuvieron un valor de  $C_{m\acute{a}x}$  similar, entre 23 y 30  $\mu$ M, lo que

indica que la dosis de aptámero (30 mg/kg) fue suficiente para lograr un exceso molar de 50 veces de aptámero en plasma frente a concentración de C5 (exceso molar de 50 veces, aproximadamente 25  $\mu\text{M}$ ). Aunque difieren en 10.000 unidades de peso molecular, ARC657 (20 kDa PEG) (SEC ID N°: 61) y ARC658 (30 kDa PEG) (SEC ID N°: 62) tuvieron una exposición similar (ABC), valores de  $t_{1/2}(\alpha)$  y  $t_{1/2}(\beta)$ . Por el contrario, ARC187 (SEC ID N°: 5) tuvo valores de exposición (ABC) significativamente mayores, una  $t_{1/2}(\alpha)$  prolongada y una  $t_{1/2}(\beta)$  ligeramente mayor que las otras moléculas.

Se analizaron a continuación alícuotas adicionales de las muestras de plasma recogidas durante el estudio de farmacocinética *in vitro* para determinar la eficacia del bloqueo de C5 de primate. Se efectuó el ensayo de activación de zimosano como se describe anteriormente para determinar la cantidad de C5b-9 y C5a de primate generada, respectivamente. Los datos se representaron en varios formatos distintos, incluyendo concentración de C5b-9 frente al tiempo de muestra (Figura 43a), concentración de C5b-9 frente a concentración de aptámero (Figura 43b), Concentración de C5a frente a tiempo de muestra (Figura 43c), y concentración de C5a frente a concentración de aptámero (Figura 43d).

El aptámero de PEG de 40 kDa ARC187 (SEC ID N°: 5) inhibió la escisión de C5 de primate (concentración de C5b-9 y C5a) durante el periodo más largo de tiempo (Figuras 43a y 43c). Cuando se representaron los datos de C5b-9 y C5a frente a concentración de aptámero, se indicó que la concentración de aptámero bloqueante de C5 tenía que exceder un exceso molar de 30 veces, independientemente del tamaño de las moléculas de PEG, para que la escisión de C5 se inhibiese por completo (Figuras 43b y 43d).

En resumen, los datos del estudio FC/FD de macaco cinomolgo demuestran que (a) como se anticipó, era necesario al menos un exceso molar de 30 veces de aptámero (concentración de aptámero en plasma de aproximadamente 15  $\mu\text{M}$ ) para inhibir la escisión de C5 *in vivo* en el macaco cinomolgo, independientemente del tamaño del grupo PEG, (b) los aptámeros bloqueantes de C5 no causaron toxicidad evidente en estas especies, y (c) cuando se dosificó a los animales a niveles relativamente elevados (exceso molar de 50 veces), los niveles de aptámero en plasma se encontraron dentro del intervalo de ensayo adecuado durante el periodo de muestreo para permitir el cálculo de parámetros farmacocinéticos.

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

El estudio 2 fue similar en diseño al estudio 1 descrito anteriormente, con las siguientes excepciones a) solo se evaluaron 2 compuestos (ARC658 (SEC ID N°: 63) y ARC187 (SEC ID N°: 5); b) el número de animales se aumentó a cuatro por grupo; y c) la muestra de plasma de 1 minuto se eliminó y se sustituyó con una muestra de 144 horas para asegurarse de que el cálculo de semivida terminal se basase en más puntos de datos. La formulación y dosificación de estos dos aptámeros, muestreo de sangre y técnicas de aislamiento de plasma fueron idénticos a los métodos descritos anteriormente en el estudio 1. El diseño para el estudio 2 se resume en la Figura 44.

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

La concentración de aptámero en plasma se representó en función del tiempo (Figura 45) y los datos primarios para AR658 (SEC ID N°: 63) y ARC187 (SEC ID N°: 5) se representan en forma de tabla en las Figuras 39 y 40, respectivamente. El aptámero de PEG de 40 kDa de ARC187 (SEC ID N°: 5) persistió en plasma durante el periodo más largo de tiempo. La inspección de la Figura 45 indicó que los datos se ajustarían mejor a un modelo de dos compartimentos. Por tanto, las estimaciones de parámetros farmacocinéticos comunicados en la Figura 46 se derivaron del modelo de dos compartimentos usando WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

Comparando los parámetros farmacocinéticos generados durante el estudio 1 de FC/FD y el estudio 2 anterior, los datos para ARC658 (SEC ID N°: 63) y ARC187 (SEC ID N°: 5) fueron similares con la excepción de la medida de  $t_{1/2}(\alpha)$  para ARC187. Aunque no se desea estar unidos a teoría alguna, la discrepancia en las medidas de la  $t_{1/2}(\alpha)$  para ARC187 entre los dos estudios se deben probablemente al pequeño tamaño de la muestra en el estudio piloto.

Como se demuestra en la Figura 46, los valores de  $C_{\text{máx}}$  fueron similares para ARC658 (SEC ID N°: 63) y ARC187 (SEC ID N°: 5). Por el contrario, la exposición a fármaco (ABC) fue significativamente mayor en animales tratados con ARC187 (SEC ID N°: 5). Asimismo, ARC187 tenía valores prolongados de  $t_{1/2}(\alpha)$  y  $t_{1/2}(\beta)$  en comparación con ARC658 (SEC ID N°: 62). Estos datos, junto con los datos generados durante el estudio 1 de FC/FD indican que de los aptámeros bloqueantes de C5, ARC187 puede proporcionar el bloque *in vivo* más efectivo de C5 para una dosis dada.

Se analizaron a continuación alícuotas adicionales de las muestras de plasma recogidas durante el estudio de farmacocinética *in vitro* para determinar la eficacia del bloqueo de C5 de primate. Como en el caso anterior, se efectuó el ensayo de activación de zimosano para determinar la cantidad de C5b-9 y C5a de primate respectivamente, generada. Los datos se representaron como concentración de C5b-9 frente a concentración de aptámero (Figura 47) y concentración de C5a frente a concentración de aptámero (Figura 48). Como se demostró



anteriormente durante el estudio 1 de FC/FD, la concentración de aptámero bloqueante de C5 debe exceder un exceso molar de 30 veces (concentración de aptámero a C5 en plasma), o aproximadamente 15  $\mu\text{M}$ , independientemente del tamaño de la molécula de PEG, para que la escisión de C5 de primate se inhibiese por completo (Figuras 41 y 42).

Inspeccionando los datos en las tablas de las Figuras 39 y 40, es evidente que después de un bolo I.V. de 30 mg/kg, ARC658 (SEC ID N°: 62) permanece por encima de 15  $\mu\text{M}$  durante aproximadamente 4 horas mientras que ARC187 permanece por encima de 15  $\mu\text{M}$  durante aproximadamente 8 horas. Por tanto, dada una dosis de fármaco similar, el aptámero ARC187 de 40 K proporciona eficacia clínica durante aproximadamente el doble de tiempo que el aptámero ARC658 de 30 K (SEC ID N°: 62).

En resumen, se debe tratar a los macacos cinomolgo con un exceso molar de al menos 30 veces de aptámero frente a C5 en plasma para bloquear la conversión de C5 *in vivo*. Estos datos son coherentes con estudios anteriores *in vitro* (hemólisis) y *ex vivo* (corazón de ratón aislado perfusionado) que sugirieron que los aptámeros de unión a C5 tenían una menor afinidad por C5 de primate frente a C5 humano. Se ha demostrado que los aptámeros bloqueantes de C5 pueden administrarse de manera segura como bolo intravenoso a una dosis de hasta 30 mg/kg, que equivale a aproximadamente a un exceso molar de 50 veces el aptámero frente a concentración de C5.

#### Ejemplo 5G: ARC1905 en el macaco cinomolgo después de administración de bolo IV

La farmacodinámica del inhibidor de C5 ARC1905 se evaluó en el macaco cinomolgo después de administración intravenosa. La formulación de ARC1905 para inyección fue en suero salino estándar a 7,5 mg/ml y las formulaciones de dosificación se esterilizaron por filtración (0,2  $\mu\text{m}$ ) en viales de dosificación pre-esterilizados en condiciones asépticas. Los monos cinomolgo (n = 4) se dosificaron a 0 (control de salino) o 30 mg/kg mediante administración de bolo intravenoso. Las muestras de sangre se obtuvieron a través de una vena periférica o del puerto de acceso arterial y las muestras de sangre (0,5 ml) se transfirieron a tubos de EDTA dipotásico ( $\text{K}_2$ ), se colocaron sobre hielo húmedo, y se centrifugaron antes de 30 minutos de la recolección a aproximadamente 4 °C.

Las muestras de plasma se analizaron *in vitro* para determinar la eficacia de ARC1905 en el bloqueo de C5 de primate. El ensayo de zimosano descrito anteriormente respecto de ARC1905 en el Ejemplo 1C se usó para determinar la cantidad de C5a de primate generado. La disminución en los valores de C5a después de zimosano a las 0,5 y 2 horas después de la dosificación indica que ARC1905 inhibe la escisión de C5 *in vivo* en el macaco cinomolgo de modo similar a ARC187 cuando se dosifica a aproximadamente la misma concentración y la misma vía de administración medido *in vitro* usando el ensayo de activación por zimosano.

#### Ejemplo 5H: Farmacocinética y farmacodinámica del inhibidor de C5 ARC187 en el macaco cinomolgo después de administración IV de bolo e infusión

También se evaluaron los perfiles farmacocinéticos (FC) y farmacodinámicos (FD) de ARC187 (SEC ID N°: 5) en macacos cinomolgo después de un bolo de carga intravenoso seguido inmediatamente por la iniciación de una infusión intravenosa. Este diseño de estudio se muestra en la Figura 49.

La dosis de carga de bolo y velocidad de infusión necesaria para lograr el objetivo de concentración en estado estacionario en plasma de 1  $\mu\text{M}$  se calcularon usando los parámetros farmacocinéticos derivados del estudio solo de bolo IV listados en la Figura 50.

Se administró un bolo IV de ARC187 a 1 mg/kg a un total de 3 macacos cinomolgo, seguido inmediatamente por la iniciación de una infusión IV a una velocidad de 0,0013 mg/kg/min durante un periodo de 48 horas. Se recogieron muestras de sangre completa desde las 0 hasta las 192 horas después del tratamiento, se almacenaron sobre hielo húmedo, se procesaron para plasma, y después se almacenaron congeladas a -80 °C. La concentración de ARC187 en las muestras de plasma se determinó usando un ensayo de tinción fluorescente de ácidos nucleicos (descrita en el Ejemplo 5N) y un ensayo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) validado por GLP. El método de ensayo de HPLC para la determinación de ARC187 en plasma de mono se validó por ClinTrials Bio-Research (Montreal, Canadá). La validación del estudio cumplió con las regulaciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP, por sus siglas en inglés Good Laboratory Practices) de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos (21 CFR §58). El método de ensayo de HPLC se validó respecto a: selectividad, linealidad, límite inferior de cuantificación (LIDC), continuidad, precisión y exactitud intra-ensayo, precisión y exactitud inter-ensayo, estabilidad de la solución madre, estabilidad del medio de inyección, estabilidad de la matriz a corto plazo, estabilidad a congelación-descongelación, estabilidad de la matriz a largo plazo e integridad en dilución. El intervalo de concentración dinámica lineal utilizable del ensayo se determinó como de 0,080 a 50,0  $\mu\text{M}$ .

El perfil FC medido de ARC187 en estas condiciones se ajustó bien al perfil calculado generado usando solo los parámetros FC de bolo IV (véase la Figura 51). La concentración diana en plasma de 1  $\mu\text{M}$  se estableció en < 5 min después de la dosis y se mantuvo durante la duración completa de la infusión. Después de detener la infusión, el aptámero mostró una semivida de eliminación,  $t_{1/2}$  ( $\beta$ ) ~ 40-60 horas.

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

#### Ejemplo 5l: Predicción de necesidades de dosificación en seres humanos

Las necesidades de dosificación en seres humanos para la prevención, mejora, o tratamiento de complicaciones relacionadas con cirugía CABG se basan en las siguientes asunciones: primera, se administrará a los pacientes de CABG una sola dosis en bolo intravenosa del aptámero anti-C5 antes de empezar la cirugía, seguida de una infusión continua para establecer y mantener una concentración en estado estacionario de 1,5  $\mu\text{M}$  durante 24-48 horas después de la cirugía CABG. Las estimaciones de dosis de bolo y velocidad de infusión se basan en cálculos usando los parámetros farmacocinéticos derivados de los estudios de solo bolo IV y bolo más infusión descritos anteriormente en macacos cinomolgo. La dosis del bolo de ARC187 estimada es 1 mg/kg, y la velocidad de infusión asociada es 0,0013 mg/kg/min. Para este régimen de bolo más 48 horas de infusión, la necesidad de fármaco total anticipada es 0,4 g para ARC187, donde la masa se refiere solo a peso de oligonucleótido (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 meso del grupo PEG conjugado a la porción de oligonucleótido de ARC187, la columna tres se refiere al peso molecular de la porción de oligonucleótido de ARC187 (y será igual para todos los aptámeros del presente documento que comprendan ARC186 (SEC ID N°: 4) como su secuencia de oligonucleótidos), la columna 4 se refiere al peso molecular de PEG de 40 kDa conjugado a ARC186 (SEC ID N°: 4) mediante química reactiva de amina como se describe en el Ejemplo 3C anterior, la columna 5 se refiere a la semivida de fase  $\alpha$  de ARC187 en un modelo de dos compartimentos, y la columna seis se refiere a la semivida de fase  $\beta$  de ARC187 en un modelo de dos compartimentos.

#### EJEMPLO 6

##### **Aptámeros anti-C5 e interacción con heparina/protamina**

Una aplicación anticipada del aptámero anti-C5 es un profiláctico para la prevención o mitigación de los efectos secundarios inflamatorios asociados con la cirugía de revascularización de la arteria coronaria (CABG). Altas concentraciones del anticoagulante heparina (3 - 5 unidades/ml o 1 - 2  $\mu\text{M}$ ) se administran normalmente durante la CABG para prevenir la trombosis y mantener la permeabilidad dentro de los componentes de la bomba de revascularización; la reversión del efecto de la heparina después del procedimiento, y la restauración de la homeostasis normal, se logra mediante la administración de concentraciones similarmente altas de protamina (~ 5  $\mu\text{M}$ ). Dados los peligros potenciales para los pacientes de cualquier interferencia en la efectividad de cualquiera de estos fármacos, no fue necesario demostrar que los aptámeros anti-C5 (1) no alteran las actividades de ambos fármacos y (2) no muestran efectos inherentes sobre la homeostasis que puedan complicar el tratamiento anticoagulante del paciente.

La heparina es un polisacárido sulfatado con una carga neta negativa y una masa molecular media de aproximadamente 15 kDa que ejerce un efecto inhibitorio sobre un número de proteasas en la cascada de coagulación promoviendo interacciones con antitrombina. La protamina, un polipéptido cargado muy positivamente, es capaz de bloquear la actividad de la heparina a través de una interacción poco caracterizada que es al menos en parte de naturaleza electrostática. En núcleo funcional de ARC187 (SEC ID N°: 5), al igual que la heparina, es elevadamente aniónico. Por tanto, es concebible que ARC187 se una no específicamente a sitios de unión a heparina o a protamina e interfiera con las actividades de estas moléculas. Los siguientes estudios investigaron las propiedades anticoagulantes inherentes (es decir, de tipo heparina) de ARC187, los efectos de ARC187 sobre la función de la heparina, los efectos de ARC187 sobre la neutralización de la heparina por protamina, y los efectos de protamina sobre las propiedades inhibitorias de complemento de ARC187.

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

Los efectos inherentes de ARC187 (SEC ID N°: 5) sobre la capacidad de coagulación de la sangre se investigaron usando pruebas clínicas estándar de los brazos extrínsecos en intrínsecos de la cascada de coagulación, el tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), respectivamente. Tal como se muestra en la Figura 54, la titulación de plasma humano citrado con concentraciones en exceso de las dosis proyectadas (hasta 20  $\mu\text{M}$ ) no dieron como resultado un cambio en el PT, y solo una leve elevación del aPTT.

Para determinar los efectos *in vitro* de ARC187 sobre las funciones de heparina y protamina, se recogió sangre de 3 individuos en 4-5 unidades/ml de heparina, dosis asociadas con los niveles de heparina en la cirugía CABG. La

capacidad de coagulación de estas muestras se determinó usando el tiempo de coagulación activada (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 a partir de un valor inicial de ~ 150 segundos a ~ 500 segundos en presencia de 4 U/ml de heparina o a ~ 800 segundos en presencia de 5 U/ml de heparina. La adición de ARC187 10  $\mu$ M a estas muestras tuvo poco efecto sobre el tiempo de coagulación, lo que demuestra que ARC187 no interfiere con la actividad anticoagulante de la heparina.

El efecto anticoagulante de la heparina se neutralizó fácilmente mediante titulación con protamina hasta 6-8  $\mu$ M (4 U/ml de heparina) o 12  $\mu$ M (5 U/ml de heparina). Los valores de ACT en presencia de heparina y concentraciones neutralizantes de protamina fueron esencialmente indistinguibles respecto de los valores iniciales. Ya que el núcleo de ácido nucleico de ARC187 (12 kDa) es de mayor peso molecular que la protamina (5 kDa), podría esperarse que concentraciones equimolares de ARC187 añadidas a protamina sean suficientes para revertir por completo la actividad neutralizante de la protamina. Sin embargo, la preincubación de protamina con concentraciones aproximadamente equivalentes de ARC187 tuvo poco efecto sobre el ACT. Las muestras de sangre que contenían concentraciones neutralizantes de protamina mostraron valores de ACT similares en presencia o ausencia de ARC187 10  $\mu$ M, lo que indica que ARC187 solo tiene un efecto pequeño, en caso de haberlo, sobre la actividad procoagulante de protamina. Estos resultados se resumen en la Figura 55.

#### Ejemplo 6B: Efectos *in vivo* de ARC187 sobre la coagulación

Las interacciones entre la función de heparina y protamina durante la administración concurrente de aptámero anti-C5 ARC187 (SEC ID N°: 5), a dosis clínicas de heparina y dosis clínicas/subclínicas/superclínicas de protamina se investigaron para determinar si la presencia de concentraciones en plasma clínicas/subclínicas/superclínicas de ARC187 podrían interferir con la reversión de la anticoagulación de la heparina por protamina. Los resultados del estudio se resumen en la Figura 56. Brevemente, los valores iniciales de ACT no se vieron afectados por 10  $\mu$ M (es decir, un exceso molar de 10 veces la dosis clínica) de ARC187 a todas las dosis de heparina ensayadas. De manera similar, el alcance de la anticoagulación por heparina no se vio afectado por ARC187 10  $\mu$ M. En ausencia de ARC187, la dosis mínima eficaz de protamina fue ~ 30 % (dosis clínica = 100 %). Además, la reversión de la anticoagulación de heparina por protamina al 30 % no se vio afectada por un exceso molar de 10 veces la dosis clínica (es decir, 10  $\mu$ M) de ARC187. Por tanto, el uso de ARC187 para la inhibición de complemento en una configuración clínica (por ejemplo, CABG) no debe verse afectada por el uso concurrente de heparina y protamina a dosis típicas.

#### Ejemplo 6C: Efecto de heparina y protamina sobre la función anti-complemento de AR187

Los efectos de heparina y protamina sobre la actividad anti-complemento de ARC187 (SEC ID N°: 5) se examinaron en muestras de sangre completa citrada activada con zimosano, tal como se describe en el Ejemplo 1. Justo antes de la activación con zimosano, se tituló ARC187 en muestras de sangre citrada tratada en cuatro condiciones: 1) sin tratamiento (sin heparina o protamina); 2) 4 U/ml de heparina; 3) 6  $\mu$ M de protamina; 4) 4 U/ml de heparina + 6  $\mu$ M de protamina. Después de la activación con zimosano, se cuantificó la actividad de C5 mediante medida de ELISA de sC5b-9 en plasma (kit ELISA de C5b-9, Quidel, San Diego, CA). Para cada condición, los resultados, expresados como inhibición porcentual de activación de C5 frente a concentración de ARC187, fueron indistinguibles dentro del error (véase la Figura 57). En todos los casos, se logró una inhibición completa con 1-2  $\mu$ M de ARC187. Por tanto, la heparina y la protamina, por separado o combinadas a concentraciones relevantes para su uso en cirugía de CABG, no parecen afectar a la actividad anti-complemento de ARC187.

### EJEMPLO 7

#### **Neovascularización coroidal**

La neovascularización coroidal inducida por láser se usa a menudo como modelo para la degeneración macular asociada a la edad. También puede usarse como modelo para retinopatía diabética. El efecto de administrar los agentes anti-C5, que, en realizaciones preferidas de la presente invención son los aptámeros anti-complemento descritos en el presente documento, sobre la prevención así como sobre la estabilización y/o regresión de la neovascularización coroidal se determina en este modelo como se describe más adelante y por Krzystolik, M.G. et al., Arch Ophthalmol., vol. 120, págs 338-346 (2002).

En los casos donde se determina la prevención de la neovascularización coroidal, el agente anti-C5, en particular un aptámero específico de C5 que se une a e inhibe la función de la proteína C5 de complemento de cinomolgo, se inyecta por vía intravítrea en un ojo de cada macaco cinomolgo mientras que el ojo de control recibe vehículo. De días a semanas después de la inyección de aptámero, se efectúa la fotocoagulación por láser en ambos ojos de cada mono cinomolgo. Se controlan los ojos de cada animal mediante examen oftalmológico, fotografía a color y angiografía de fluoresceína. En los casos donde la incidencia de neovascularización coroidal (determinada angiográficamente) es significativamente menor en ojo tratado con agente anti-C5, en particular, un aptámero específico de C5, que en el ojo de control, el agente específico anti-C5 se considera efectivo. En los casos donde se

determina la prevención de la neovascularización coroidal con una combinación de agente anti-C5 y un agente anti-VEGF y/o un agente anti-PDGF, se sigue el procedimiento anterior excepto en que uno ojo de cada animal se trata con el agente anti-C5 y el agente anti-VEGF y/o agente anti-PDGF de días a semanas antes de la fotocoagulación láser.

5 En otra realización, en los casos donde se determina la prevención de la neovascularización coroidal, el aptámero anti-complemento, en particular un aptámero que inhibe la función de una proteína de complemento de cinomolgo, tal como C5 o C3, se inyecta por vía intravítrea en un ojo de cada macaco cinomolgo mientras que el ojo de control recibe vehículo. De días a semanas después de la inyección de aptámero, se efectúa la fotocoagulación por láser en  
10 ambos ojos de cada macaco cinomolgo. Se controlan los ojos de cada animal mediante examen oftalmológico, fotografía a color y angiografía de fluoresceína. En los casos donde la incidencia de neovascularización coroidal (determinada angiográficamente) es significativamente menor en el ojo tratado con aptámero anti-complemento que en el ojo de control, el aptámero anti-complemento se considera efectivo. En los casos donde se determina la prevención de la neovascularización coroidal con una combinación de aptámero anti-complemento y un agente anti-  
15 VEGF y/o un agente anti-PDGF, se sigue el procedimiento anterior excepto en que uno ojo de cada animal se trata con el aptámero anti-complemento y el agente anti-VEGF y/o agente anti-PDGF de días a semanas antes de la fotocoagulación láser.

20 En los casos donde se determina la estabilización y/o regresión de la neovascularización coroidal, se efectúa la fotocoagulación por láser en ambos ojos de cada macaco cinomolgo. De días a semanas después de la fotocoagulación láser, se administra un agente anti-C5 de la presente invención mediante inyección por vía intravítrea a un ojo de cada animal mientras que el otro ojo recibe vehículo. En una realización, este agente anti-C5 es un aptámero anti-complemento. En una realización preferida, dicho aptámero anti-complemento es un aptámero que inhibe a C5 y/o a C3. Se controlan los ojos de cada animal mediante examen oftalmológico, fotografía a color y  
25 angiografía de fluoresceína. En los casos donde la incidencia de neovascularización coroidal (determinada angiográficamente) es la misma y/o significativamente menor en el ojo tratado con el agente anti-C5, en particular el tratado con aptámero de C5, que en el ojo de control, se considera que el aptámero es efectivo para la estabilización y/o regresión respectivamente. En los casos donde se determina la estabilización o regresión de neovascularización coroidal para tratamiento con una combinación de un agente anti-C5 y un agente anti-VEGF y/o un agente anti-  
30 PDGF, se sigue el procedimiento anterior excepto en que uno ojo de cada animal se trata con el agente anti-C5 y el agente anti-VEGF y/o agente anti-PDGF de días a semanas después de la fotocoagulación láser.

35 De manera similar a la determinación en macaco cinomolgo descrita inmediatamente antes, la eficacia de los agentes anti-C5 y aptámeros anti-complemento en la prevención, estabilización y/o regresión de la neovascularización coroidal solos o en combinación con un agente anti-VEGF y/o agente anti-PDGF puede determinarse en ratones u otras especies usando un agente anti-C5 que modula la proteína de complemento C5 murina, o la proteína de complemento C5 de otras especies. En otra realización, similar a la misma determinación en macaco cinomolgo descrita anteriormente, la eficacia de un aptámero anti-complemento en la prevención, estabilización y/o regresión de la neovascularización coroidal solos o en combinación con un agente anti-VEGF y/o  
40 agente anti-PDGF puede determinarse en ratones u otras especies usando un aptámero anti-complemento que modula, en particular, inhibe, la proteína de complemento de interés murina, o la proteína de complemento de interés de otras especies. Véase, por ejemplo, Bora et al., Journal of Immunology, 174: 491-497 (2005).

#### 45 **EJEMPLO 8**

##### **Modelo murino de degeneración retinal para DMAE no exudativa**

50 Un modelo de ratón que tiene una mutación bien en la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1 o Ccl-2) o en su receptor 2 de quimiocinas C-C afin (Ccr-2) imita los síntomas de la degeneración macular relacionada con la edad humana, incluyendo el desarrollo de drusas, atrofia de fotorreceptores y neovascularización coroidal. Véase Ambati et al., Nature Medicine. 2003, noviembre de 2003; 9(11): 1390-7. Este modelo de ratón muestra una acumulación significativa de C5 en el epitelio y coroides del pigmento retinario, lo que indica que se expresa complemento en asociación con la enfermedad. Además, están presentes CD46 (un regulador de complemento unido a membrana), vitronectina (un regulador de MAC) y C3c (un producto de degradación de C3b) en el epitelio  
55 y/o coroides del pigmento retinal, lo que sugiere que tiene lugar una activación de complemento.

60 En los casos donde se esté evaluando la estabilización y/o regresión de la degeneración retinal, el aptámero anti-complemento de la invención, se administra un aptámero inhibidor de C5 o C3, por ejemplo, mediante inyección intravítrea en un ojo de cada animal mientras que el otro ojo recibe vehículo. Se controlan los ojos de cada animal respecto de degeneración retinal, incluyendo la acumulación de producto de complemento en el EPR/coroide, desarrollo de electrofisiología anormal y/o atrofia localizada del EPR y/o los fotorreceptores, y la incidencia de neovascularización coroidal. En los casos donde la degeneración retinal es igual a y/o significativamente menor en el ojo tratado con aptámero anti-complemento, en particular tratado con aptámero anti-C5 o anti-C3, que en el ojo de control, se considera que el aptámero es eficaz para la estabilización y/o regresión, respectivamente.  
65

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Archemix Corporation, et al.,  
 <120> Aptámeros de unión a complemento y agentes anti-C5 útiles en el tratamiento de trastornos oculares  
 5 <130> 23239-591-061  
 <140> Aún sin asignar  
 <141> 08/03/2007  
 10 <150> N.S. EE.UU 60/780.905  
 <151> 08/03/2006  
 <150> N.S. EE.UU 60/848.274  
 15 <151> 29/09/2006  
 <160> 102  
 <170> PatentIn version 3.2  
 20 <210> 1  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> aptámero sintético  
 <220>  
 30 <221> característica\_miscelánea  
 <223> la citosina en las posiciones 3, 4, 6 y 37 son 2'-fluoro  
 <220>  
 35 <221> característica\_miscelánea  
 <223> la uridina en las posiciones 9, 30 y 31 son 2'-fluoro  
 <220>  
 40 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> n en la posición 1 es 2'-fluoro citidina o 2'-O-metil citidina  
 <220>  
 45 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (2)..(2)  
 <223> n en la posición 2 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina  
 <220>  
 50 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (7)..(7)  
 <223> n en la posición 7 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina  
 <220>  
 55 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> n en la posición 8 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina  
 <220>  
 60 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (10)..(10)  
 <223> n en la posición 10 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina  
 <220>  
 65 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (11)..(11)  
 <223> n en la posición 11 es 2'-fluoro uridina o desoxi timidina

5  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (12)..(12)  
 <223> n en la posición 12 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina

10  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n en la posición 13 es 2'-OH adenosina o 2'-O-metil adenosina

15  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (14)..(14)  
 <223> n en la posición 14 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina

20  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n en la posición 15 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina

25  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n en la posición 16 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina

30  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n en la posición 18 es 2'-fluoro citosina o 2'-O-metil citosina

35  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> n en la posición 19 es 2'-fluoro uridina o 2'-O-metil uridina

40  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (20) .. (20)  
 <223> n en la posición 20 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina

45  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (21) .. (21)  
 <223> n en la posición 21 es 2'-OH adenosina o 2'-O-metil adenosina

50  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (22)..(22)  
 <223> n en la posición 22 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina

55  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (23)..(23)  
 <223> n en la posición 23 es 2'-fluoro uridina o desoxi timidina

60  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (24)..(24)  
 <223> n en la posición 24 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina

65  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (25)..(25)  
 <223> n en la posición 25 es 2'-fluoro uridina o desoxi timidina

<220>

## ES 2 562 423 T3

- <221> característica\_miscelánea  
<222> (26)..(26)  
<223> n en la posición 26 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina
- 5 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (27)..(27)  
<223> n en la posición 27 es 2'-OH adenosina o 2'-O-metil adenosina
- 10 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (28)..(28)  
<223> n en la posición 28 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina
- 15 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (29) .. (29)  
<223> n en la posición 29 es 2'-fluoro uridina o desoxi timidina
- 20 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (32)..(32)  
<223> n en la posición 32 es 2'-OH adenosina o 2'-O-metil adenosina
- 25 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (33)..(33)  
<223> n en la posición 33 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina
- 30 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (34)..(34)  
<223> n en la posición 34 es 2'-fluoro citosina o desoxi citidina
- 35 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (35) .. (35)  
<223> n en la posición 35 es 2'-fluoro uridina o desoxi timidina
- 40 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (36)..(36)  
<223> n en la posición 36 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina
- 45 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (38)..(38)  
<223> n en la posición 38 es 2'-OH guanosina o 2'-O-metil guanosina
- 50 <400> 1  
nncgcgnun nnnnnngnnn nnnnnnnnu unnnnncn 38
- <210> 2  
<211> 38
- 55 <212> ADN  
<213> secuencia artificial
- <220>  
<223> aptámero sintético
- 60 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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
- 65

ES 2 562 423 T3

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la  
 5 posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
  
 <400> 2  
 cgccgagguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38  
  
 10 <210> 3  
 <211> 42  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 20 <222> (1)..(42)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro  
  
 <400> 3  
 gacgaugcgg ucucaugcgu cgagugugag uuuaccuucg uc 42  
 25  
 <210> 4  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 35 <222> (1)..(38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro  
  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 40 <222> (1)..(38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y en la  
 posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
  
 45 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (39)..(39)  
 <223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')  
 50 <400> 4  
 cgccgagguc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39  
  
 <210> 5  
 <211> 39  
 55 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
 60  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> la citosina en la posición 1 se modifica mediante un PEG de (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-  
 65 butamida)) de 40 kDa ramificado unido al nucleótido a través de un enlazante de amina



<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro  
 5

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

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (39)..(39)  
 <223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')  
 15

<400> 5  
 cgccgcggucc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 6  
 <211> 44  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 20

<220>  
 <223> aptámero sintético  
 25

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(44)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro  
 30

<400> 6  
 aggacgaugc ggucucaugc gucgagugug aguuuaccuu cguc 44  
 35

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

<220>  
 <223> aptámero sintético

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (40)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro  
 45

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(40)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 2, 7 y 19, en las que guanosina es 2'-OH, y las  
 50 posiciones 1 y 34, en las que adenosina es 2'-OH

<400> 7  
 agcgccgagg ucucaggcgc ugagucugag uuuaccugcg 40  
 55

<210> 8  
 <211> 40  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 60

<220>  
 <223> aptámero sintético  
 65

<220>

<221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (40)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

5      <400> 8  
          agcgcgcgcg ucucaggcgc ugagucugag uuuaccugcg      40

<210> 9  
 <211> 39  
 10      <212> ADN  
          <213> secuencia artificial  
          <220>  
          <223> aptámero sintético

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

20      <220>  
          <221> característica\_miscelánea  
          <222> (1) .. (38)  
          <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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> característica\_miscelánea  
          <222> (39) .. (39)  
          <223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 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

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

50      <220>  
          <221> característica\_miscelánea  
          <222> (1) .. (38)  
          <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro, 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-metil; y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina

55      <220>  
          <221> característica\_miscelánea  
          <222> (39) .. (39)  
          <223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')

60      <400> 10  
          cgccgcgguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcgt      39

65      <210> 11  
          <211> 38  
          <212> ADN

<213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
 5  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil, excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la  
 10 posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 15 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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 cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38  
 <210> 12  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
 <220>  
 30 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la  
 posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
 35 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 1, 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es  
 40 desoxi, y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina  
 <400> 12  
 cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38  
 <210> 13  
 45 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> aptámero sintético  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 55 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la  
 posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 60 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 3, 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es  
 desoxi; y las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina  
 <400> 13  
 65 cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38

## ES 2 562 423 T3

- 5  
 <210> 14  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial
- 10  
 <220>  
 <223> aptámero sintético
- 15  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 20  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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  
 cgccgcggucc tcaggcgcu agtctgaguu uaccugcg 38
- 30  
 <210> 15  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial
- 35  
 <220>  
 <223> aptámero sintético
- 40  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 45  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16, y 24, en las que citidina es desoxi; en la posición 3, en las que citosina es 2'-O-metil; y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina
- 50  
 <400> 15  
 cgccgcggucc tcaggcgcu agtctgaguu uaccugcgt 38
- 55  
 <210> 16  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial
- 60  
 <220>  
 <223> aptámero sintético
- 65  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 70  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en la posición 37, en las que citosina es 2'-O-metil; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

<400> 16  
cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38

5 <210> 17  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> aptámero sintético

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

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

25 <400> 17  
cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 18  
<211> 38  
30 <212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> aptámero sintético

35 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH

40 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
45 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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-metil; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

<400> 18  
50 cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 19  
<211> 38  
<212> ADN  
55 <213> secuencia artificial

<220>  
<223> aptámero sintético

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

65 <220>

<221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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

5

<400> 19  
 cgccgcggucc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

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

10

<220>  
 <223> aptámero sintético

15

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

20

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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

25

<400> 20  
 cgccgcggucc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

30

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

35

<220>  
 <223> aptámero sintético

40

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

45

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

50

<400> 21  
 cgccgcggucc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

55

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

60

<220>  
 <223> aptámero sintético

65

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil, excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la

posición 32, en las que adenosina es 2'-OH

- 5 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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
- 10 <400> 22  
cgccgagguc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38
- 15 <210> 23  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial
- 20 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 25 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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
- 30 <400> 23  
cgccgagguc tcaggcgctg agtctgaguu uaccugcg 38
- 35 <210> 24  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial
- 40 <220>  
<223> aptámero sintético
- 45 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 50 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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
- 55 <400> 24  
cgccgagguc tcaggcgctg agtctgaguu uaccugcg 38
- 60 <210> 25  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial
- 65 <220>  
<223> aptámero sintético  
  
<220>

<221> característica\_misclánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
 5  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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  
 10  
 <400> 25  
 cgccgagguc tcaggcgug agtctgagtu uaccugcg 38  
 15  
 <210> 26  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
 25  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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  
 30  
 <400> 26  
 cgccgagguc tcaggcgug agtctgagut uaccugcg 38  
 35  
 <210> 27  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
 45  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-etil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
 50  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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  
 55  
 <400> 27  
 cgccgagguc tcaggcgug agtctgaguu taccugcg 38  
 60  
 <210> 28  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 65  
 <220>



<223> aptámero sintético

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

<220>  
 10 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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

15 <400> 28  
 cgccgcggucc tcaggcgug agtctgagtt taccugcg 38

<210> 29  
 <211> 38  
 20 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> aptámero sintético

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

30 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 35 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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

<400> 29  
 40 cgccgcggucc tcaggcgug agtctgaguu uacctgcg 38

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

45 <220>  
 <223> aptámero sintético

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

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 55 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro excepto en las posiciones 10, 12, 16, 24, 33 y 34, en las que citidina es desoxi; en la posición 9, en las que uridina es 2'-O-metil; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

60 <400> 30  
 cgccgcggucc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 31  
 <211> 38  
 65 <212> ADN

<213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
 5  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la  
 10 posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 15 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi;  
 en la posición 4, en las que citosina es 2'-O-metil; y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina  
 <400> 31  
 20 cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38  
 <210> 32  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
 <220>  
 30 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la  
 posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
 35 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi;  
 40 en la posición 6, en las que citosina es 2'-O-metil; y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina  
 <400> 32  
 cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38  
 <210> 33  
 45 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> aptámero sintético  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 55 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la  
 posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 60 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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-etil; y en las posiciones 11, 23, y 25, que son desoxi timidina  
 <400> 33  
 65 cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38

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

<400> 36  
cgccgcggucc ucaggcgug agucugaguu uaccugcg 38

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

10 <220>  
<223> aptámero sintético

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

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

25 <400> 37  
cgccgcggucc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

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

35 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH

40 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en la posición 30, en las que uridina es 2'-O-metil; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

45 <400> 38  
cgccgcggucc tcaggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

50 <210> 39  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

55 <220>  
<223> aptámero sintético

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

65 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)

## ES 2 562 423 T3

<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en la posición 31, en las que uridina es 2'-O-metil; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

- 5 <400> 39  
cgccgcggucc tcaggcgcu agtctgaguu uaccugcg 38
- 10 <210> 40  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial
- 15 <220>  
<223> aptámero sintético
- 20 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 25 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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-metil; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
- 30 <400> 40  
cgccgcggucc tcaggcgcu agtctgaguu uaccugcg 38
- 35 <210> 41  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial
- 40 <220>  
<223> aptámero sintético
- 45 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 50 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 10, 12, 16 y 24, en las que citidina es desoxi; en la posición 35, en las que uridina es 2'-O-metil; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina
- 55 <400> 41  
cgccgcggucc tcaggcgcu agtctgaguu uaccugcg 38
- 60 <210> 42  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial
- 65 <220>  
<223> aptámero sintético
- 70 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en la posición 5, en las que guanosina es desoxi; en la posición 17, en las que guanosina es 2'-OH; y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 5 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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  
 10 cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38  
  
 <210> 43  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 15  
  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
  
 <220>  
 20 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en la posición 5, en las que guanosina es 2'-OH; en la posición  
 17, en las que guanosina es desoxi; y la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH  
  
 <220>  
 25 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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  
 30  
  
 <400> 43  
 cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38  
  
 <210> 44  
 35 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 40 <223> aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (38)  
 45 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH; y la  
 posición 32, en las que adenosina es desoxi  
  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 50 <222> (1) .. (38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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> 44  
 55 cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38  
  
 <210> 45  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 60 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
  
 <220>  
 65 <221> característica\_miscelánea

## ES 2 562 423 T3

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

5 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (40)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 11, 13, 17 y 25, en las que citidina es desoxi; en la posición 40, en las que citosina es 2'-O-metil; y en las posiciones 12, 24 y 26, que son desoxi timidina

10 <400> 45  
gcgucgcggu ctcaggcgcu gagtctgagu uuaccuacgc 40

15 <210> 46  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

20 <220>  
<223> aptámero sintético

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

<220>  
<221> característica\_miscelánea  
30 <222> (1) .. (38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; 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-metil; y en las posiciones 11, 23 y 25, que son desoxi timidina

35 <400> 46  
gggcgcggu ctcaggcgcu agtctgagu uaccuccc 38

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

<220>  
<223> aptámero sintético

45 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (40)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 6 y 18, en las que guanosina es 2'-OH; y la posición 33, en las que adenosina es 2'-OH

50 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1) .. (40)  
55 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 11, 13, 17 y 25, en las que citidina es desoxi; en la posición 40, en las que citosina es 2'-O-metil; y en las posiciones 12, 24 y 26, que son desoxi timidina

<400> 47  
60 ggcggcggu ctcaggcgcu gagtctgagu uuaccugcgc 40

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

65 <220>

<223> aptámero sintético  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 5 <222> (1) .. (44)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 8 y 20, en las que guanosina es 2'-OH; y en la posición 35, en la que adenosina es 2'-OH  
 <220>  
 10 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (44)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro  
 <220>  
 15 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (45)..(45)  
 <223> la timidina en la posición 45 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')  
 <400> 48  
 20 ggacgccgcg gucucaggcg cugagucuga guuuaccugc gucut 45  
 <210> 49  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 25 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
 <220>  
 30 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (42)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que guanosina es 2'-OH; y en la posición 34, en las que adenosina es 2'-OH  
 35 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (42)  
 <223> todas las citosinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 12, 14, 18, 26, 35 y 36, que son desoxi citidina; y en las posiciones 20, 41 y 42, en las que citosina es 2'-O-metil  
 40 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (42)  
 45 <223> todas las uridinas son 2'-fluoro; excepto en la posición 21, en las que uridina es 2'-O-metil; y en las posiciones 13, 25, 27, 31 y 37, que son desoxi timidina  
 <400> 49  
 50 ggcgccgcg uctcaggcgc ugagtctgag tuuacctgcg cc 42  
 <210> 50  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> aptámero sintético  
 <220>  
 60 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (42)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que guanosina es 2'-OH; y en la posición 34, en las que adenosina es 2'-OH  
 65 <220>  
 <221> característica\_miscelánea



## ES 2 562 423 T3

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

5      <220>  
          <221> característica\_miscelánea  
          <222> (1) .. (42)  
          <223> la uridina en la posición 11 es 2'-fluoro; la uridina en la posición 21 es 2'-O-metil; las posiciones 13, 25, 27, 31, 32, 33 y 37 son desoxi timidina

10     <400> 50  
          ggcgccgcg uctcaggcgc ugagtctgag ttacctgcg cc 42

15     <210> 51  
          <211> 42  
          <212> ADN  
          <213> secuencia artificial

20     <220>  
          <223> aptámero sintético

         <220>  
          <221> característica\_miscelánea

25     <222> (1) .. (42)  
          <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que guanosina es 2'-OH

         <220>  
          <221> característica\_miscelánea

30     <222> (1) .. (42)  
          <223> la citosina en las posiciones 5, 6, 8, 12, 14, 18, 26, 35, 36 y 39 son desoxi citidina; y la citosina en las posiciones 3, 20, 41 y 42 son 2'-O-metil

         <220>  
          <221> característica\_miscelánea

35     <222> (1) .. (42)  
          <223> la uridina en la posición 21 es 2'-O-metil; las posiciones 11, 13, 25, 27, 31, 32, 33 y 37 son desoxi timidina

         <400> 51  
          ggcgccgcg tctcaggcgc ugagtctgag ttacctgcg cc 42

40     <210> 52  
          <211> 42  
          <212> ADN  
          <213> secuencia artificial

45     <220>  
          <223> aptámero sintético

50     <220>  
          <221> característica\_miscelánea  
          <222> (1) .. (42)  
          <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que guanosina es 2'-OH

55     <220>  
          <221> característica\_miscelánea  
          <222> (1) .. (42)  
          <223> la uridina en las posiciones 13, 21, 25 y 27 son 2'-O-metil; las posiciones 11, 31, 32, 33 y 37 son desoxi timidina

60     <220>  
          <221> característica\_miscelánea  
          <222> (1) .. (42)  
          <223> la citosina en las posiciones 5, 6, 8, 12, 18, 35, 36 y 39 son desoxi citidina; y la citosina en las posiciones 3, 14, 20, 26, 41 y 42 son 2'-O-metil

65     <220>  
          <221> característica\_miscelánea  
          <222> (1) .. (42)  
          <223> la citosina en las posiciones 5, 6, 8, 12, 18, 35, 36 y 39 son desoxi citidina; y la citosina en las posiciones 3, 14, 20, 26, 41 y 42 son 2'-O-metil

ES 2 562 423 T3

<400> 52  
 ggcgccgcg tcucagcgcg ugagucugag ttacctgcg cc 42

5 <210> 53  
 <211> 40  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> aptámero sintético

15 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> la adenosina en la posición 1 tiene una biotina conjugada al extremo 5'

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

25 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (40)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

30 <400> 53  
 agcgccgcg ucucagcgcg ugagucugag uuuaccugcg 40

35 <210> 54  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

40 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (42)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 7 y 19, en las que guanosina es 2'-OH; y en la posición 34, en las que adenosina es 2'-OH

45 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (42)  
 <223> todas las citosinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 12, 14, 18 y 26, que son desoxi citidina; y en las posiciones 41 y 42, en las que citosina es 2'-O-metil

50 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (42)  
 <223> todas las uridinas son 2'-fluoro; las posiciones 13, 25, y 27 son desoxi timidina

55 <400> 54  
 ggcgccgcg uctcagcgcg ugagtctgag uuuaccugcg cc 42

60 <210> 55  
 <211> 42  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial

65 <220>  
 <223> aptámero sintético

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

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (42)  
 <223> todas las citosinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 12, 14, 18, 26, 41 y 42, en las que citosina es  
 10 2'-O-metil

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1) .. (42)  
 <223> todas las uridinas son 2'-fluoro; excepto en las posiciones 13, 25, y 27, en las que uridina es 2'-O-metil  
 15

<400> 55  
 ggcgcccggc ucucaggcgc ugagucugag uuuaccugcg cc 42  
 20

<210> 56  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 25

<220>  
 <223> aptámero sintético

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro  
 30

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH  
 35

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (39)..(39)  
 <223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')  
 40

<400> 56  
 cgcccgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39  
 45

<210> 57  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 50

<220>  
 <223> aptámero sintético

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(38)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en la posición 18, en las que citosina es 2'-O-metil; y en la  
 55 posición 19 en la que uridina es 2'-O-metil

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

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

# ES 2 562 423 T3

5  
<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (39)..(39)  
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')

<400> 57  
cgccgcggucc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

10  
<210> 58  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

15  
<220>  
<223> aptámero sintético

20  
<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en la posición 29, que es desoxi timidina

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

30  
<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (39)..(39)  
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')

35  
<400> 58  
cgccgcggucc ucaggcgug agucugagtu uaccugcgt 39

40  
<210> 59  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

45  
<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH

50  
<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en la posición 18, en las que citosina es 2'-O-metil; y la posición 19, en las que uridina es 2'-O-metil

55  
<220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (39)..(39)  
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')

60  
<400> 59  
cgccgcggucc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

65  
<210> 60  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> aptámero sintético

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

10 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro; excepto en la posición 18, en las que citosina es 2'-O-metil; en la posición 19, en las que uridina es 2'-O-metil; y en la posición 29, que es desoxi timidina

15 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (39)..(39)  
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')

20 <400> 60  
cgccgcggucc ucaggcgug agucugagtu uaccugcgt 39

25 <210> 61  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

30 <220>  
<223> aptámero sintético

35 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(1)  
<223> la citosina en la posición 1 se modifica mediante un PEG de 20 kDa unido al nucleótido mediante un enlazante de amina

40 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

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

50 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (39)..(39)  
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')

55 <400> 61  
cgccgcggucc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39

60 <210> 62  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

65 <220>  
<223> aptámero sintético

65 <220>  
<221> característica\_miscelánea

## ES 2 562 423 T3

- <222> (1)..(1)  
<223> la citosina en la posición 1 se modifica mediante un PEG de 30 kDa unido al nucleótido mediante un enlazante de amina
- 5 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro
- 10 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 15 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (39)..(39)  
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')
- 20 <400> 62  
cgccgcggucc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39
- 25 <210> 63  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> aptámero sintético
- <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(1)  
35 <223> la citosina en la posición 1 se modifica mediante un enlazante de amina 5'
- <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
40 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro
- <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
45 <223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (39)..(39)  
50 <223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')
- <400> 63  
cgccgcggucc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39
- 55 <210> 64  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial
- 60 <220>  
<223> aptámero sintético
- <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(1)  
65

## ES 2 562 423 T3

- <223> la citosina en la posición 1 se modifica mediante un PEG de 10 kDa unido al nucleótido mediante un enlazante de amina
- 5 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro
- 10 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 15 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (39)..(39)  
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')
- 20 <400> 64  
cgccgcggucc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39
- 25 <210> 65  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> aptámero sintético
- 35 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(1)  
<223> la citosina en la posición 1 se modifica mediante un PEG lineal de 40 kDa unido al nucleótido mediante un enlazante de amina
- 40 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro
- 45 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 50 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (39)..(39)  
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')
- 55 <400> 65  
cgccgcggucc ucaggcgug agucugaguu uaccugcgt 39
- 60 <210> 66  
<211> 38  
<212> ARN  
<213> secuencia artificial
- 65 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(1)

- <223> la citosina en la posición 1 se modifica mediante un PEG de 20 kDa unido al nucleótido mediante un enlazante de amina
- 5 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro
- 10 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 15 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (38)..(38)  
<223> la guanosina en la posición 3B se modifica mediante un PEG de 20 kDa unido al nucleótido mediante un enlazante de amina
- 20 <400> 66  
cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcg 38
- 25 <210> 67  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> aptámero sintético
- 35 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(1)  
<223> la citosina en la posición 1 se modifica mediante un PEG de (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo) de 40 kDa ramificado unido al nucleótido a través de un enlazante de amina
- 40 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro
- 45 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(38)  
<223> todas las purinas son 2'-O-metil; excepto en las posiciones 5 y 17, en las que guanosina es 2'-OH, y en la posición 32, en las que adenosina es 2'-OH
- 50 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (39)..(39)  
<223> la timidina en la posición 39 es una desoxi timidina 3' invertida (enlazada 3'-3')
- 55 <400> 67  
cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39
- 60 <210> 68  
<211> 46  
<212> ARN  
<213> secuencia artificial
- 65 <220>  
<223> aptámero sintético
- 65 <220>  
<221> característica\_miscelánea



ES 2 562 423 T3

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

5 <400> 68  
 ggcgauuacu gggacggacu cgcgauuguga gcccagacga cucgcc46

10 <210> 69  
 <211> 40  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial

15 <220>  
 <223> aptámero sintético

20 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(40)  
 <223> todas las pirimidinas son 2'-fluoro

25 <400> 69  
 ggcuucugaa gauuauuucg cgaugugaac uccagacccc 40

30 <210> 70  
 <211> 92  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

35 <220>  
 <223> molde sintético

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

45 <400> 70

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

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

60 <220>  
 <223> cebador sintético

65 <400> 71  
 taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctac 39

70 <210> 72  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

75 <220>  
 <223> cebador sintético

80 <400> 72  
 catcgatgat cgatcgatcg acc 23

85 <210> 73  
 <211> 22

<212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> región fija sintética  
  
 <400> 73  
 gggagaggag agaacguucu ac 22  
  
 10 <210> 74  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> región fija sintética  
  
 <400> 74  
 20 ggucgaucga ucgaucaucg aug 23  
  
 <210> 75  
 <211> 75  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
  
 <220>  
 30 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(75)  
 <223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil  
  
 <400> 75  
 35  
           **gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggggucgauc 60**  
           **gaucgaucau cgaug 75**  
  
 <210> 76  
 <211> 32  
 40 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> aptámero sintético  
 45  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(32)  
 <223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil  
 50  
 <400> 76  
 ccuugguuug gcacaggcau acauacgcag gg 32  
  
 <210> 77  
 <211> 32  
 55 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> aptámero sintético  
  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea

# ES 2 562 423 T3

<222> (1)..(32)  
<223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil

5 <400> 77  
ccuugguuug gcacaggcau acaaacgcag gg 32

10 <210> 78  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> aptámero sintético

15 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(25)  
<223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil

20 <400> 78  
ggguuuggca caggcauaca uacc25

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

30 <220>  
<223> aptámero sintético

35 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(25)  
<223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil

40 <400> 79  
ggguuuggca caggcauaca aacc25

45 <210> 80  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

50 <220>  
<223> aptámero sintético

55 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(32)  
<223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil

60 <400> 80  
ggcggcacag gcuaucacuac gcaggggucg cc32

65 <210> 81  
<211> 47  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

70 <220>  
<223> aptámero sintético

75 <220>  
<221> característica\_miscelánea  
<222> (1)..(47)  
<223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil

ES 2 562 423 T3

<400> 81  
 cguuucuaccu ugguuuggca caggcauaca uacgcagggg ucgaucg 47

5 <210> 82  
 <211> 88  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> molde sintético

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 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> molde sintético

30 <400> 83  
 cttggttgg cacaggcata catacgcagg ggtcgatcg 39

<210> 84  
 <211> 39  
 35 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador sintético

40 <400> 84  
 taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctac 39

<210> 85  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 50 <223> cebador sintético

<400> 85  
 catcgatgct agtcgtaac 19

55 <210> 86  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial

60 <220>  
 <223> región fija sintética

<400> 86

|    |   |    |           |
|----|---|----|-----------|
|    | gggagaggag agaacguucu ac  | 22 |           |
| 5  | <210> 87<br><211> 19<br><212> ARN<br><213> secuencia artificial   |    |           |
| 10 | <220><br><223> región fija sintética  |    |           |
|    | <400> 87<br>guuacgacua gcaucgaug  | 19 |           |
| 15 | <210> 88<br><211> 80<br><212> ADN<br><213> secuencia artificial   |    |           |
| 20 | <220><br><223> aptámero sintético   |    |           |
| 25 | <220><br><221> característica_miscelánea<br><222> (1)..(80)<br><223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil |    |           |
|    | <400> 88  |    |           |
|    | <b>gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggggucgauc</b>  |    | <b>60</b> |
|    | <b>gguuacgacu agcaucgaug</b>  |    | <b>80</b> |
| 30 | <210> 89<br><211> 80<br><212> ADN<br><213> secuencia artificial   |    |           |
| 35 | <220><br><223> aptámero sintético   |    |           |
| 40 | <220><br><221> característica_miscelánea<br><222> (1)..(80)<br><223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil |    |           |
| 45 | <400> 89  |    |           |
|    | <b>gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggugucgauc</b>  |    | <b>60</b> |
|    | <b>uguuacgacu agcaucgaug</b>  |    | <b>80</b> |
| 50 | <210> 90<br><211> 80<br><212> ADN<br><213> secuencia artificial   |    |           |
| 55 | <220><br><223> aptámero sintético   |    |           |
| 60 | <220><br><221> característica_miscelánea<br><222> (1)..(80)<br><223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil |    |           |

ES 2 562 423 T3

|    |   |           |
|----|---|-----------|
|    | <400> 90  |           |
|    | <b>gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uaaauacgca gggcucgauc</b>  | <b>60</b> |
|    | <b>gguuacgacu agcaucgaug</b>  | <b>80</b> |
| 5  | <210> 91<br><211> 80<br><212> ADN<br><213> secuencia artificial   |           |
| 10 | <220><br><223> aptámero sintético   |           |
| 15 | <220><br><221> característica_miscelánea<br><222> (1)..(80)<br><223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil |           |
|    | <400> 91  |           |
|    | <b>gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcccaggca uauauacgca gggauugauc</b>  | <b>60</b> |
| 20 | <b>cguuacgacu agcaucgaug</b>  | <b>80</b> |
| 25 | <210> 92<br><211> 78<br><212> ADN<br><213> secuencia artificial   |           |
| 30 | <220><br><221> característica_miscelánea<br><222> (1)..(78)<br><223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil |           |
| 35 | <400> 92  |           |
|    | <b>gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcgcaggca uacauacgca gguccgaucgg</b>   | <b>60</b> |
|    | <b>uuacgacuag caucgaug</b>  | <b>78</b> |
| 40 | <210> 93<br><211> 80<br><212> ADN<br><213> secuencia artificial   |           |
| 45 | <220><br><223> aptámero sintético   |           |
| 50 | <220><br><221> característica_miscelánea<br><222> (1)..(80)<br><223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-etil  |           |
|    | <400> 93  |           |
|    | <b>gggagaggag agaacguucu accuuguugu ggcacagcca acccuacgca cggauccgcc</b>  | <b>60</b> |
|    | <b>gguuacgacu agcaucgaug</b>  | <b>80</b> |

|    |  |                                   |
|----|--|-----------------------------------|
| 5  | <p>&lt;210&gt; 94<br/>                 &lt;211&gt; 69<br/>                 &lt;212&gt; ADN<br/>                 &lt;213&gt; secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;<br/>                 &lt;223&gt; aptámero sintético</p>              |                                   |
| 10 | <p>&lt;220&gt;<br/>                 &lt;221&gt; característica_miscelánea<br/>                 &lt;222&gt; (1)..(69)<br/>                 &lt;223&gt; en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil</p> |                                   |
| 15 | <p>&lt;400&gt; 94</p> <p><b>gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca gguucgaucgg</b></p> <p><b>uuacgacua</b></p>   | <p><b>60</b></p> <p><b>69</b></p> |
| 20 | <p>&lt;210&gt; 95<br/>                 &lt;211&gt; 79<br/>                 &lt;212&gt; ADN<br/>                 &lt;213&gt; secuencia artificial</p>   |                                   |
| 25 | <p>&lt;220&gt;<br/>                 &lt;223&gt; aptámero sintético</p>   |                                   |
| 30 | <p>&lt;220&gt;<br/>                 &lt;221&gt; característica_miscelánea<br/>                 &lt;222&gt; (1)..(79)<br/>                 &lt;223&gt; en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil</p> |                                   |
| 35 | <p>&lt;400&gt; 95</p> <p><b>gggagaggag agaacguucu accuuagguu cgcacuguca uacauacaca cgggcaaucg</b></p> <p><b>guuacgacua gcaucgaug</b></p>   | <p><b>60</b></p> <p><b>79</b></p> |
| 40 | <p>&lt;210&gt; 96<br/>                 &lt;211&gt; 75<br/>                 &lt;212&gt; ADN<br/>                 &lt;213&gt; secuencia artificial</p>   |                                   |
| 45 | <p>&lt;220&gt;<br/>                 &lt;223&gt; aptámero sintético</p>   |                                   |
| 50 | <p>&lt;220&gt;<br/>                 &lt;221&gt; característica_miscelánea<br/>                 &lt;222&gt; (1)..(75)<br/>                 &lt;223&gt; en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil</p> |                                   |
| 55 | <p>&lt;220&gt;<br/>                 &lt;221&gt; característica_miscelánea<br/>                 &lt;222&gt; (34)..(34)<br/>                 &lt;223&gt; n puede ser cualquier nucleótido (a, t, u, c, o g)</p>                            |                                   |
| 60 | <p>&lt;220&gt;<br/>                 &lt;221&gt; característica_miscelánea<br/>                 &lt;222&gt; (43)..(43)<br/>                 &lt;223&gt; n puede ser cualquier nucleótido (a, t, u, c, o g)</p>                            |                                   |
| 60 | <p>&lt;400&gt; 96</p>  |                                   |

ES 2 562 423 T3

|    |   |           |
|----|---|-----------|
|    | <b>gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcncaggca uanauacgca cggguocgauc</b>   | <b>60</b> |
|    | <b>gguuacgacu agcau</b>   | <b>75</b> |
| 5  | <210> 97<br><211> 80<br><212> ADN<br><213> secuencia artificial   |           |
| 10 | <220><br><223> aptámero sintético   |           |
| 15 | <220><br><221> característica_miscelánea<br><222> (1)..(80)<br><223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil |           |
|    | <400> 97  |           |
|    | <b>gggagaggag agaacguucu accuuucucu gccacaagca uaccuucgcg ggguuuauu</b>   | <b>60</b> |
|    | <b>gguuacgacu agcaucgaug</b>  | <b>80</b> |
| 20 | <210> 98<br><211> 79<br><212> ADN<br><213> secuencia artificial   |           |
| 25 | <220><br><223> aptámero sintético   |           |
| 30 | <220><br><221> característica_miscelánea<br><222> (1)..(79)<br><223> en el que todas las purinas son desoxi, y todas las pirimidinas son 2'-O-metil |           |
|    | <400> 98  |           |
|    | <b>gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uañauacgca gggucgaucc</b>  | <b>60</b> |
| 35 | <b>guuacgacua gcaucgaug</b>   | <b>79</b> |
| 40 | <210> 99<br><211> 93<br><212> ADN<br><213> secuencia artificial   |           |
| 45 | <220><br><223> molde sintético  |           |
| 50 | <220><br><221> característica_miscelánea<br><222> (25)..(54)<br><223> n puede ser cualquier nucleótido (a, t, c, o g)                               |           |
|    | <400> 99  |           |
|    | <b>catcgatgct agtcgtaacg atccnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnncgagaa</b>   | <b>60</b> |
|    | <b>cgttctctcc tctccctata gtgagtgta tta</b>  | <b>93</b> |



<210> 100  
 <211> 92  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 5  
 <220>  
 <223> molde sintético  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (24)..(53)  
 <223> n puede ser cualquier nucleótido (a, t, c, o g)  
 10  
 <400> 100  
 15  
**catgcatcgc gactgactag ccgnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngtagaac 60**  
**gttctctcct ctccctatag tgagtcgtat ta 92**  
 <210> 101  
 <211> 92  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 20  
 <220>  
 <223> molde sintético  
 25  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (24)..(53)  
 <223> n puede ser cualquier nucleótido (a, t, c, o g)  
 30  
 <400> 101  
**catcgatcga tcgatcgaca gcgnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngtagaac 60**  
**gttctctcct ctccctatag tgagtcgtat ta 92**  
 <210> 102  
 <211> 1676  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 35  
 <220>  
 <223> C5 sintético  
 40  
 <400> 102

ES 2 562 423 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Phe Ile Asp Pro Glu Gly Ser Glu Val Asp Met Val Glu Glu

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |
| Ile | Asp | His | Ile | Gly | Ile | Ile | Ser | Phe | Pro | Asp | Phe | Lys | Ile | Pro | Ser |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Asn | Pro | Arg | Tyr | Gly | Met | Trp | Thr | Ile | Lys | Ala | Lys | Tyr | Lys | Glu | Asp |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Phe | Ser | Thr | Thr | Gly | Thr | Ala | Tyr | Phe | Glu | Val | Lys | Glu | Tyr | Val | Leu |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Pro | His | Phe | Ser | Val | Ser | Ile | Glu | Pro | Glu | Tyr | Asn | Phe | Ile | Gly | Tyr |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Lys | Asn | Phe | Lys | Asn | Phe | Glu | Ile | Thr | Ile | Lys | Ala | Arg | Tyr | Phe | Tyr |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Asn | Lys | Val | Val | Thr | Glu | Ala | Asp | Val | Tyr | Ile | Thr | Phe | Gly | Ile | Arg |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Glu | Asp | Leu | Lys | Asp | Asp | Gln | Lys | Glu | Met | Met | Gln | Thr | Ala | Met | Gln |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Asn | Thr | Met | Leu | Ile | Asn | Gly | Ile | Ala | Gln | Val | Thr | Phe | Asp | Ser | Glu |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Thr | Ala | Val | Lys | Glu | Leu | Ser | Tyr | Tyr | Ser | Leu | Glu | Asp | Leu | Asn | Asn |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Lys | Tyr | Leu | Tyr | Ile | Ala | Val | Thr | Val | Ile | Glu | Ser | Thr | Gly | Gly | Phe |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Ser | Glu | Glu | Ala | Glu | Ile | Pro | Gly | Ile | Lys | Tyr | Val | Leu | Ser | Pro | Tyr |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Lys | Leu | Asn | Leu | Val | Ala | Thr | Pro | Leu | Phe | Leu | Lys | Pro | Gly | Ile | Pro |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Tyr | Pro | Ile | Lys | Val | Gln | Val | Lys | Asp | Ser | Leu | Asp | Gln | Leu | Val | Gly |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Gly | Val | Pro | Val | Thr | Leu | Asn | Ala | Gln | Thr | Ile | Asp | Val | Asn | Gln | Glu |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |

Thr Ser Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly  
 405 410 415

Val Ala Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu  
 420 425 430

Phe Asn Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala  
 435 440 445

Arg Glu Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr  
 450 455 460

Leu Tyr Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu  
 465 470 475 480

His Leu Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile  
 485 490 495

Thr His Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe  
 500 505 510

Gly Thr Arg Glu Lys Phe Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile  
 515 520 525

Pro Val Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr  
 530 535 540

Ile Val Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp  
 545 550 555 560

Leu Asn Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser  
 565 570 575

Pro Asp Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met  
 580 585 590

Ala Thr Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala  
 595 600 605

Val Tyr Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe  
 610 615 620

ES 2 562 423 T3

Gln Phe Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu  
625 630 635 640

Asn Asn Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn  
645 650 655

Ala Asn Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile  
660 665 670

Leu Arg Pro Arg Arg Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala  
675 680 685

Lys Tyr Lys His Ser Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys  
690 695 700

Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu  
705 710 715 720

Gly Pro Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser  
725 730 735

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 562 423 T3

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

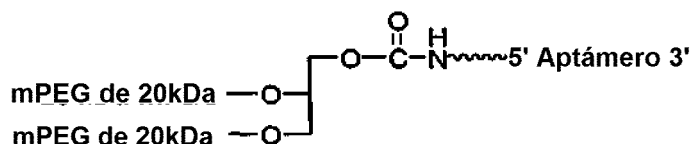
1. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) de tipo no exudativo, comprendiendo el método la etapa de administrar un aptámero pegilado o no pegilado a un sujeto que lo necesite, en donde el aptámero pegilado o no pegilado se une al complemento de C5 y tiene la secuencia de SEC ID N°: 4.


2. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende adicionalmente la etapa de administrar al sujeto un agente anti-VEGF, en donde el agente anti-VEGF es un anticuerpo antagonista o un fragmento de anticuerpo contra VEGF.

3. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el aptámero pegilado o no pegilado o el agente anti-VEGF se administran mediante administración ocular, administración Intravítrea o administración periocular.

4. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aptámero pegilado o no pegilado o el agente anti-VEGF están presentes en una formulación de depósito.

5. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aptámero está pegilado y tiene la siguiente fórmula:

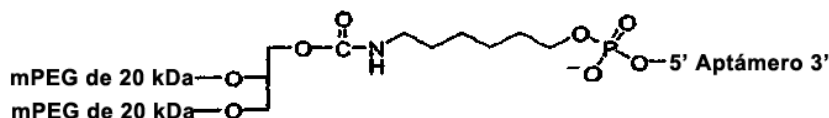


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde  indica un enlazador, y Aptámero = fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCf CfUm GfCmG-3T (SEC ID N°: 4), en donde fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, mG y mA = nucleótidos 2'-OMe, siendo todos los demás nucleótidos 2'-OH, e indicando 3T una desoxitimidina invertida.

6. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el enlazador es un enlazador de alquilo.

7. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo exudativo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el enlazador de alquilo comprende de 2 a 18 grupos CH<sub>2</sub> consecutivos.

8. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aptámero está pegilado y tiene la siguiente estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde Aptámero = fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCf CfUm GfCmG-3T (SEC ID N°: 4), en donde fC y fU = nucleótidos 2'-fluoro, mG y mA = nucleótidos 2'-OMe, siendo todos los demás nucleótidos 2'-OH, e indicando 3T una desoxitimidina invertida.

9. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde el agente anti-VEGF es un fragmento de anticuerpo antagonista dirigido contra VEGF.

10. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el fragmento de anticuerpo antagonista dirigido contra

VEGF es ranibizumab.

- 5 11. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde el agente anti-VEGF es un anticuerpo antagonista dirigido contra VEGF.
- 10 12. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el anticuerpo antagonista dirigido contra VEGF es bevacizumab.
- 15 13. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el aptámero pegilado o no pegilado y el agente anti-VEGF se administran de manera secuencial o de manera sustancialmente simultánea.
- 20 14. Un aptámero pegilado o no pegilado para su uso en un método para tratar, estabilizar y/o prevenir la DMAE de tipo no exudativo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende adicionalmente, antes de administrar el aptámero pegilado o no pegilado al sujeto, la etapa de detectar (i) la presencia de drusas en ausencia de una pérdida clínica de agudeza visual o (ii) una variación en el factor H de complemento del sujeto, identificando de este modo un sujeto en riesgo de desarrollar DMAE de tipo no exudativo.



Figura 2

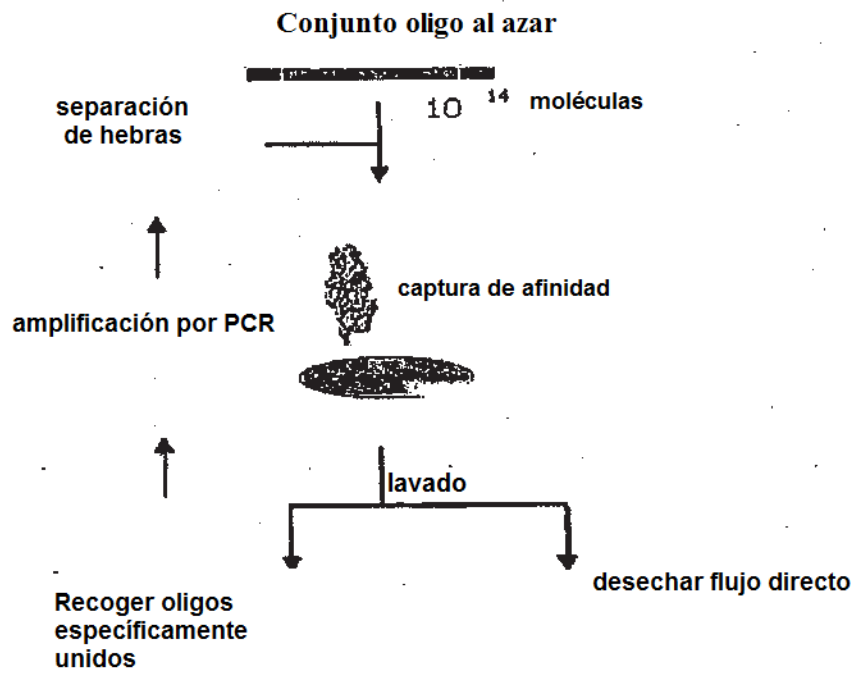






Figura 4

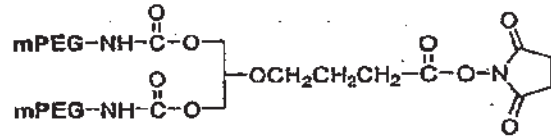
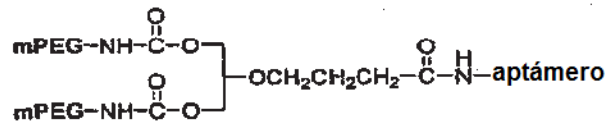
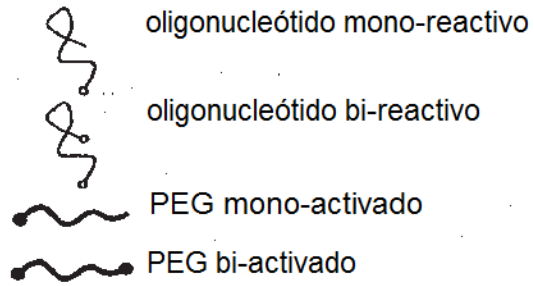


Figura 5





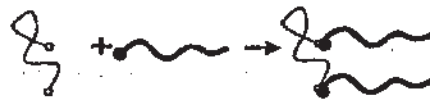
**Figura 6**



**PEGilación convencional**



**PEGilación múltiple**



**PEGilación mediante dimerización**



Figura 7A

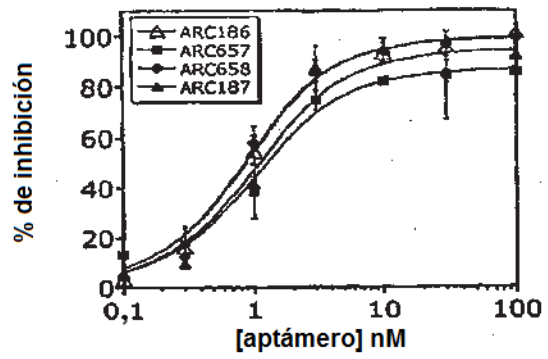


Figura 7B

| N° DE ARC | Modificación de 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])-<br>propil-2-(4'-butamida)<br>ramificado de 40 kDa | 0,6 ±0,2  |

Figura 7C

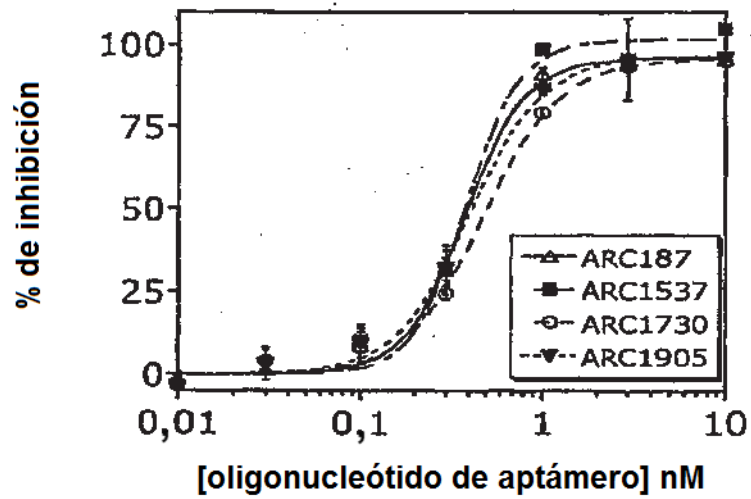


Figura 7D

| Nº de ARC | Modificación de PEG  | CI50 (nM)   |
|-----------|--|-------------|
| 187       | 1,3 bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida) ramificado de 40 K | 0,38 ± 0,03 |
| 1537      | Dow lineal de 40 K   | 0,39 ± 0,06 |
| 1730      | 2 x 20K lineal   | 0,48 ± 0,04 |
| 1905      | 2,3 bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo ramificado de 40 K    | 0,40 ± 0,03 |

Figura 8

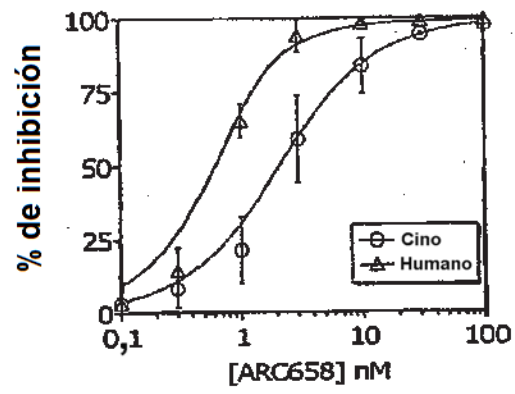


Figura 9

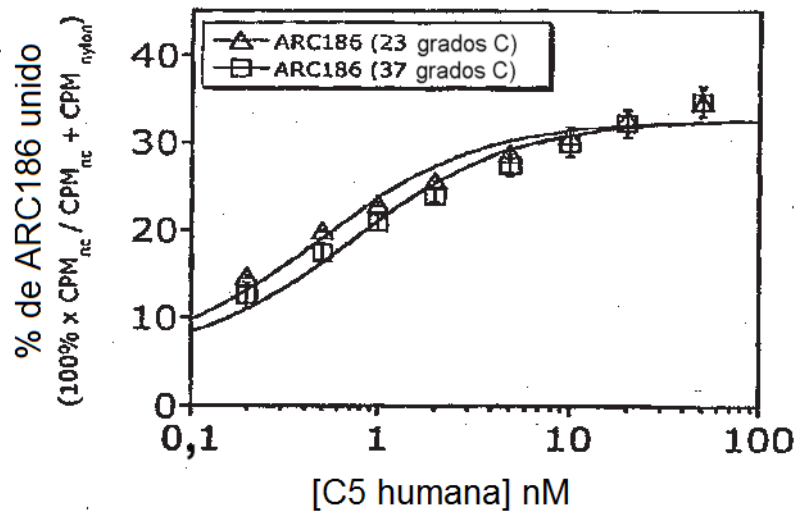


Figura 10

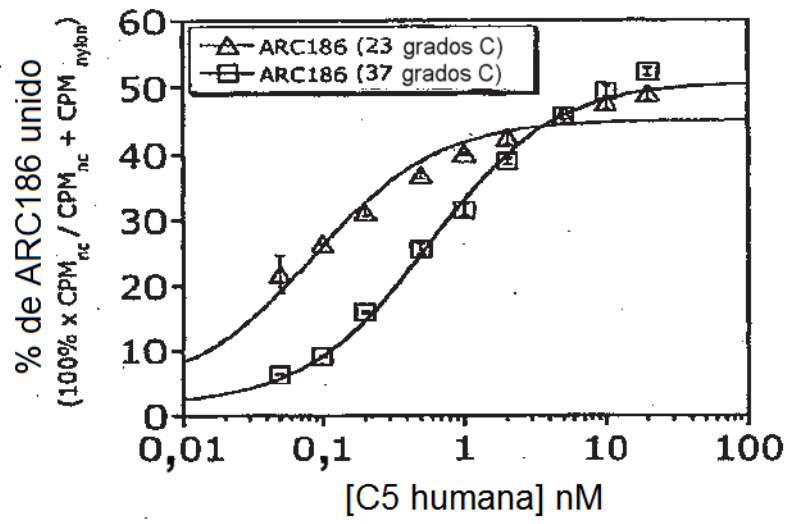


Figura 11

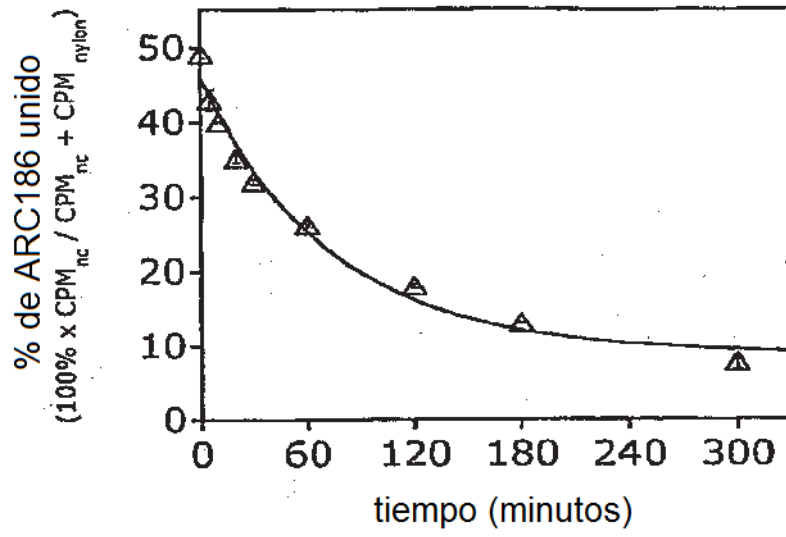


Figura 12

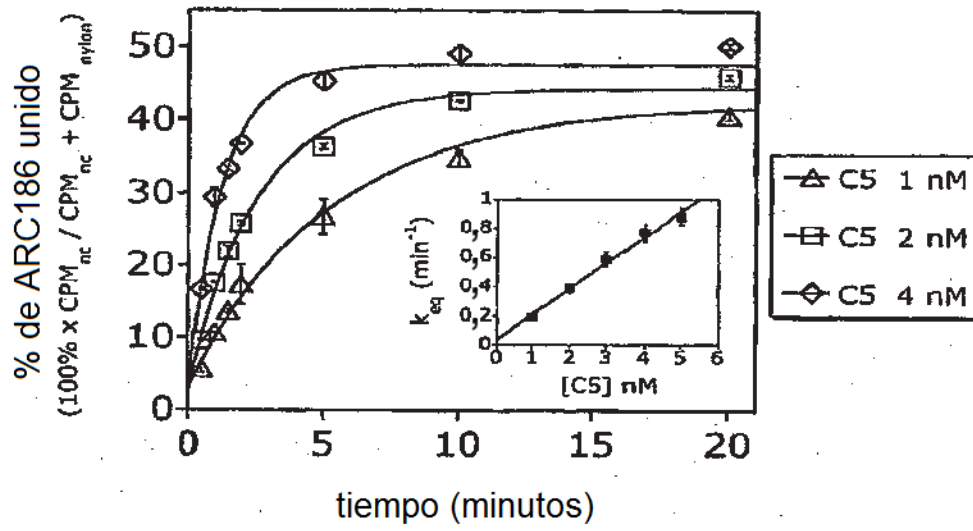




Figura 13

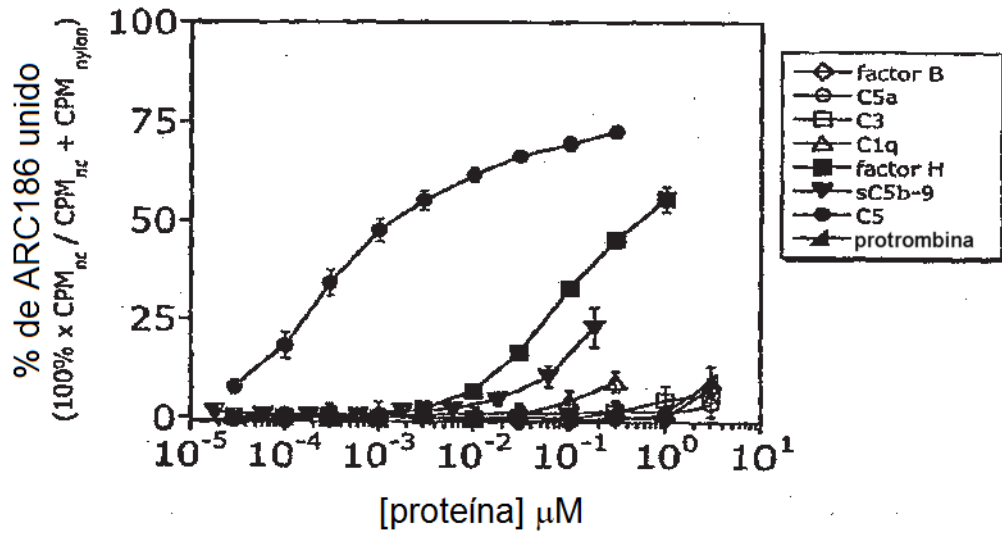


Figura 14

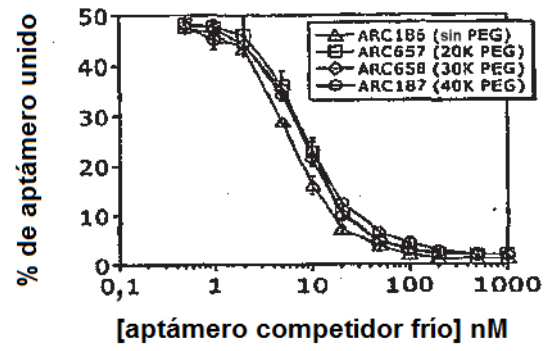


Figura 15

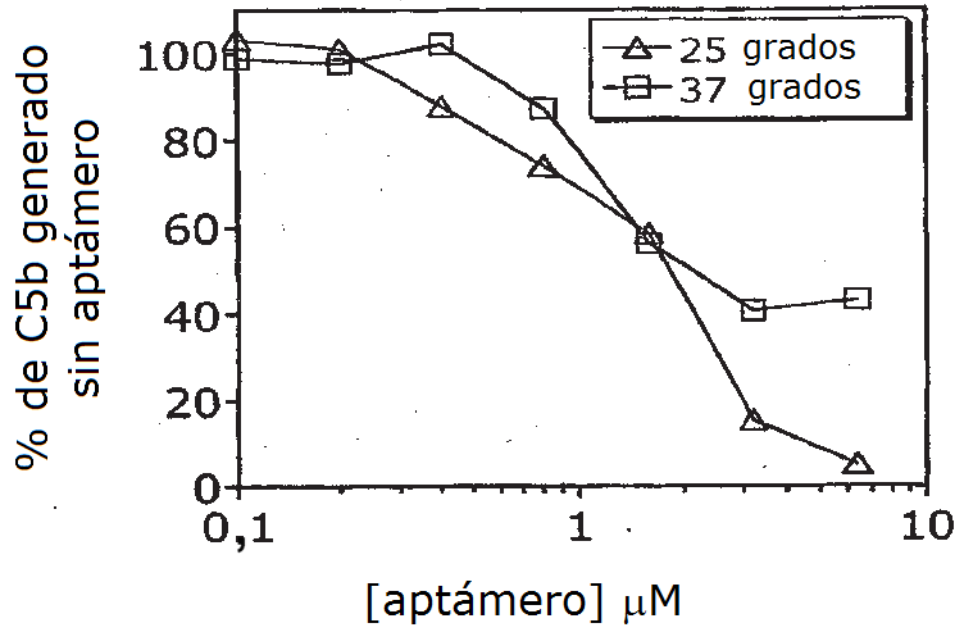


Figura 16

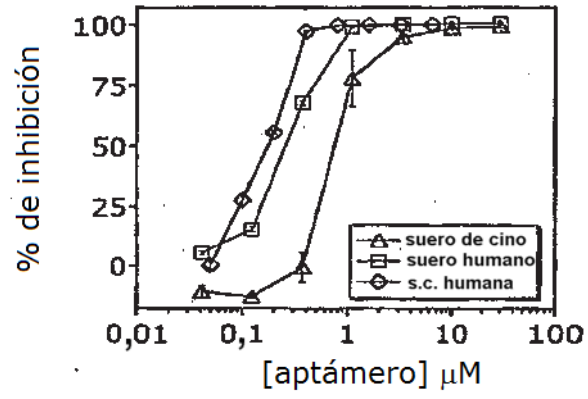


Figura 17

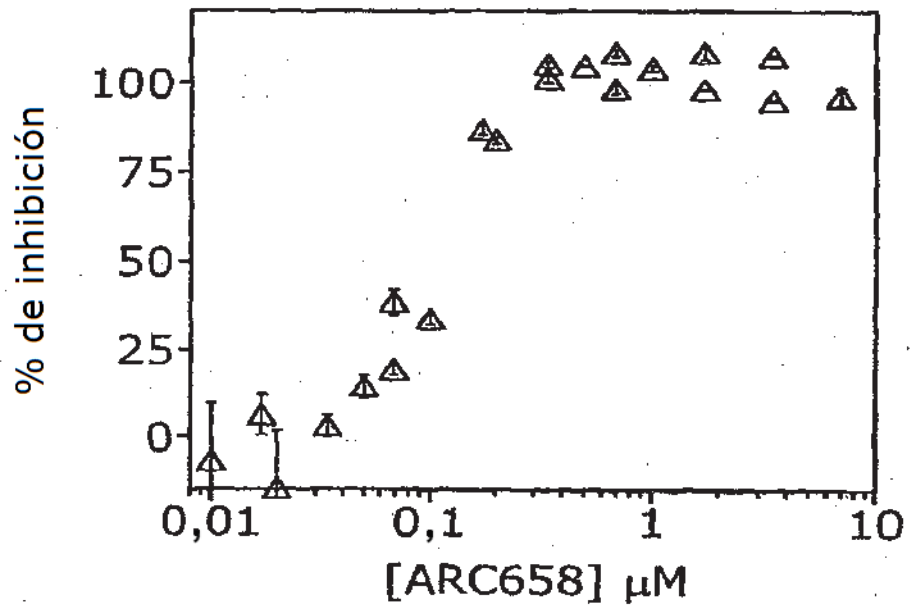


Figura 18

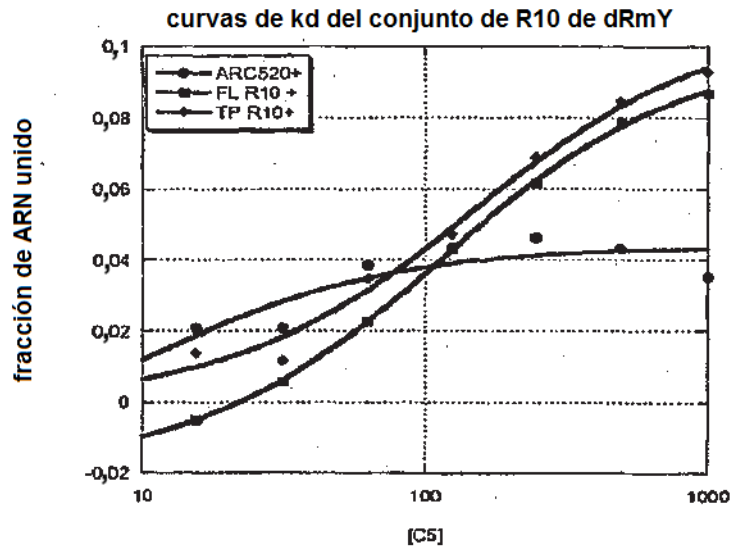


Figura 19

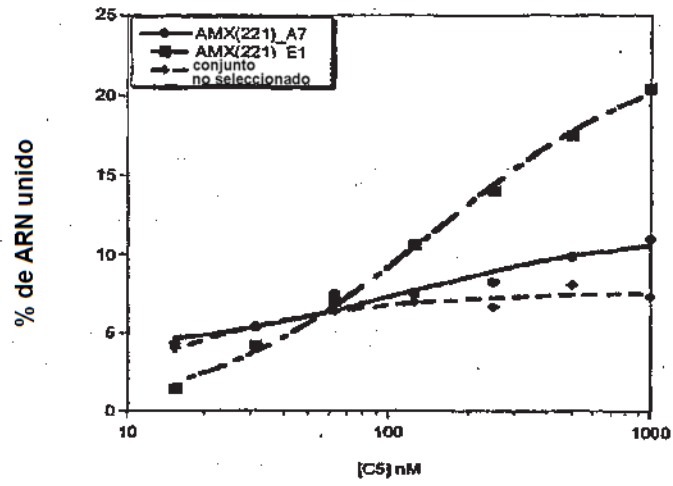


Figura 20

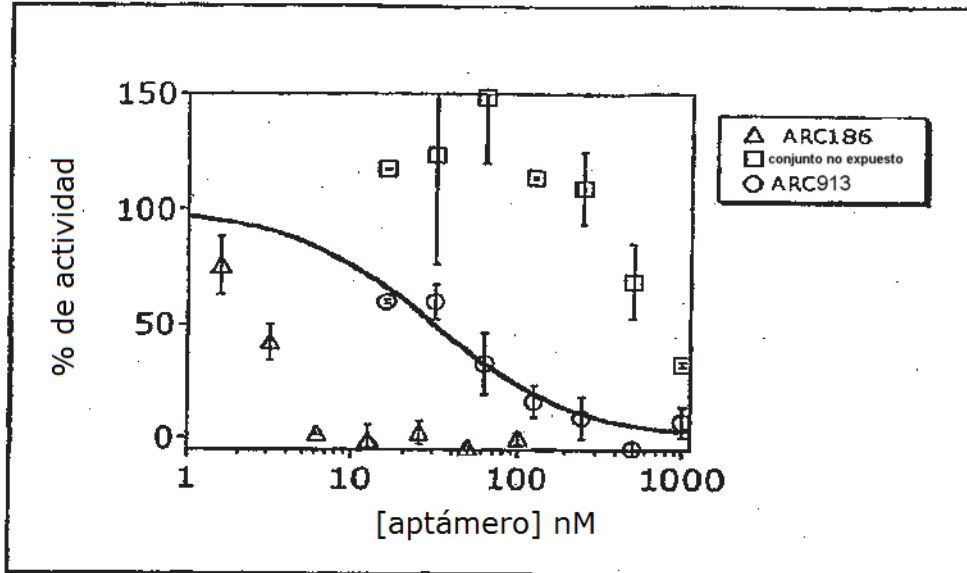
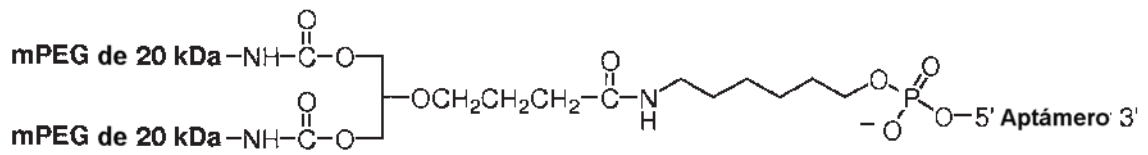




Figura 21

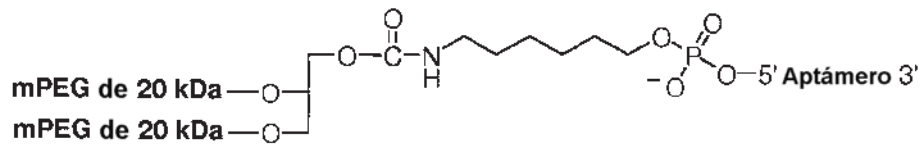


**Aptámero =**

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfU  
fUAfCfCfUmGfCmG-3T (SEC ID N° : 4)

ARC187 (SEC ID N° : 5)

Figura 22



**Aptámero =**

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfU  
fUafCfCfUmGfCmG-3T (SEC ID N° : 4)

ARC1905 (SEC ID N° : 67)

Figura 23

| 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 del ventrículo izquierdo |
| 3     | 3             | Aptámero irrelevante a relación molar 50 X | 1500       | 3                             | Frecuencia cardiaca, ritmo, presión del ventrículo izquierdo |
| 4     | 3             | ARC 186 a equivalencia molar               | 30         | 3                             | Frecuencia cardiaca, ritmo, presión del ventrículo izquierdo |
| 5     | 5             | ARC 186 relación molar 10 X                | 300        | 3                             | Frecuencia cardiaca, ritmo, presión del ventrículo izquierdo |
| 6     | 4             | ARC 186 a relación molar 50 X              | 1500       | 3                             | Frecuencia cardiaca, ritmo, presión del ventrículo izquierdo |

Figura 24

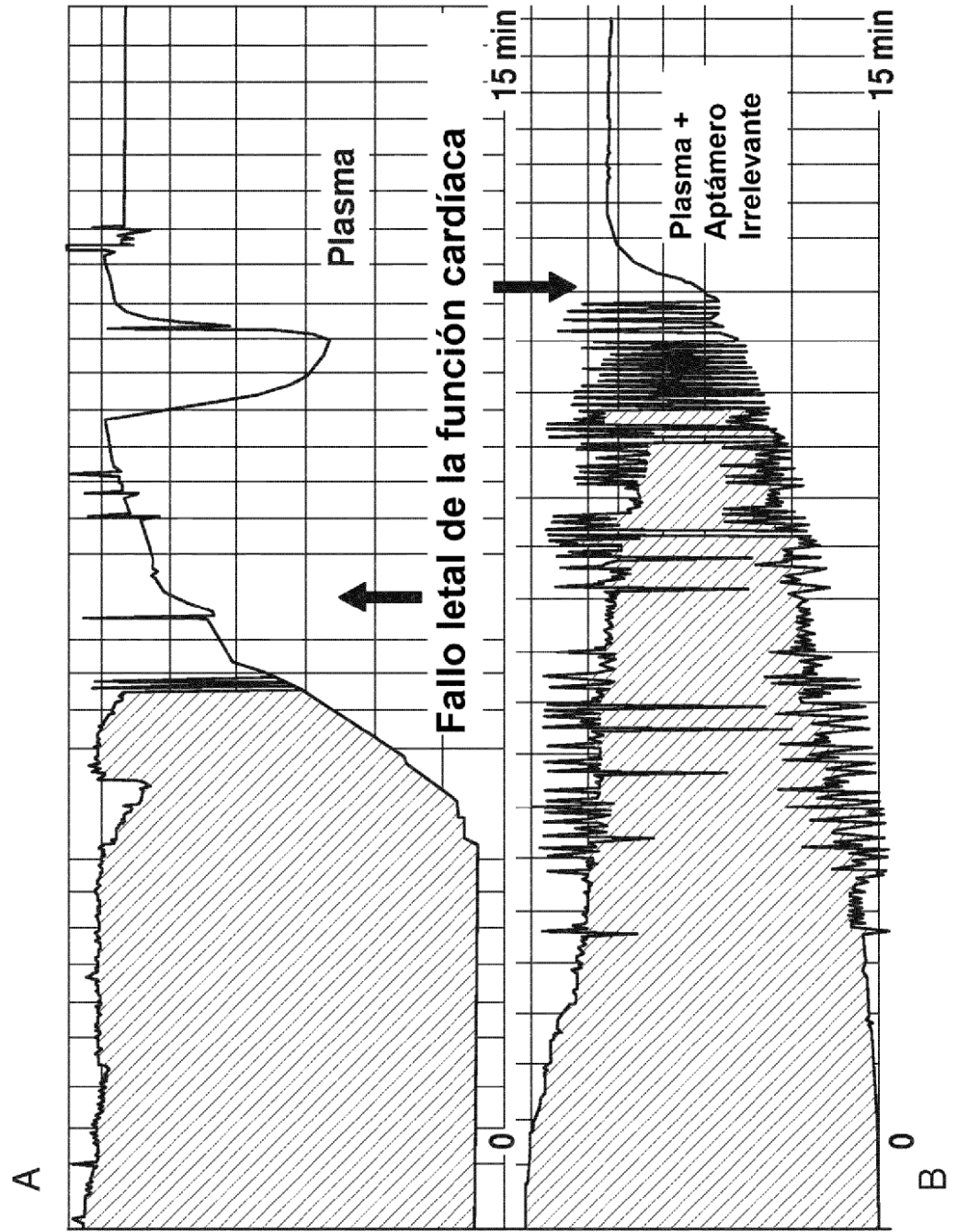


Figura 25

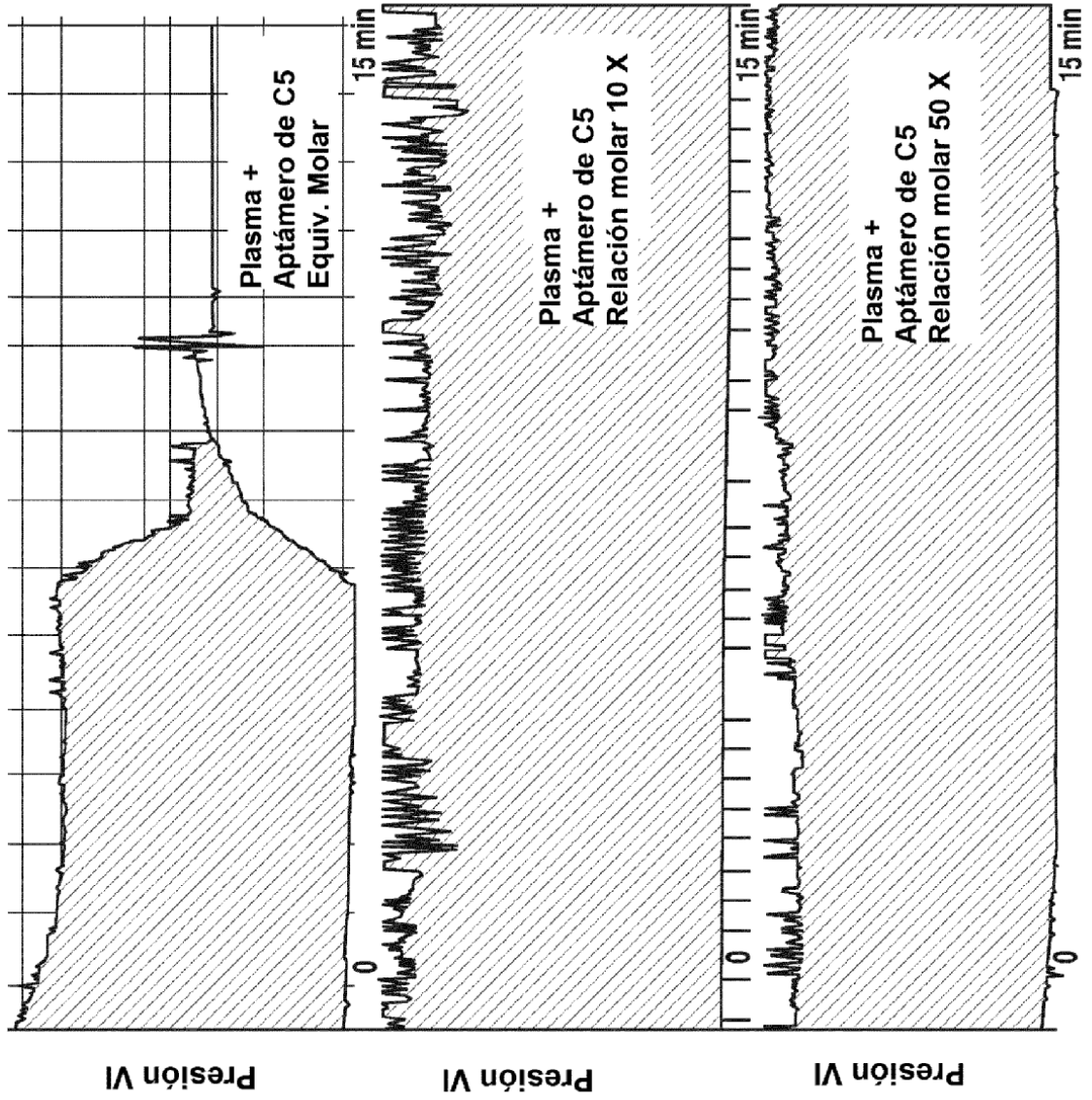


Figura 26

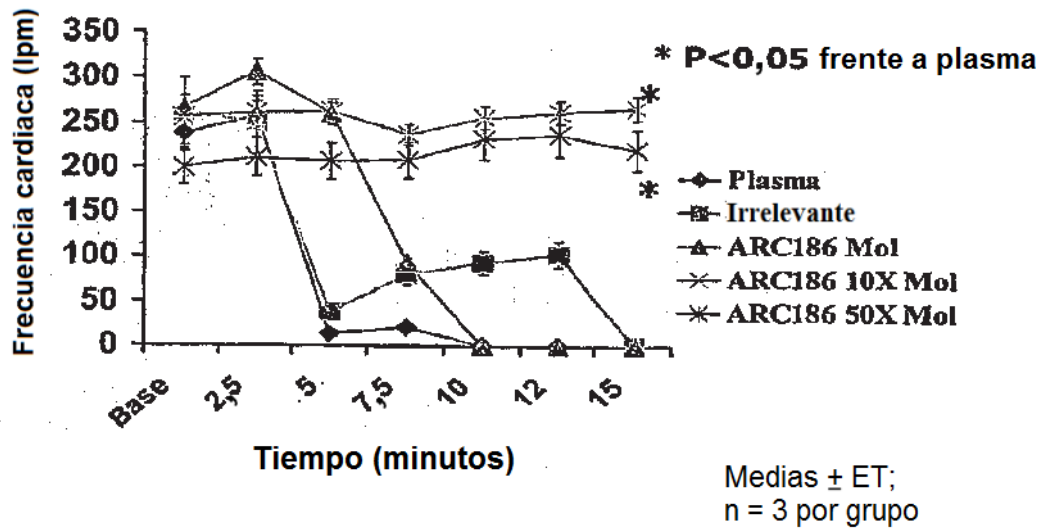


Figura 27

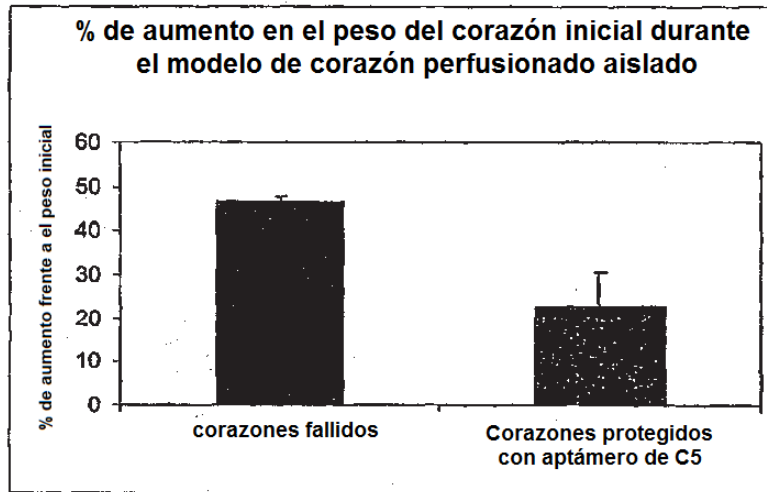


Figura 28

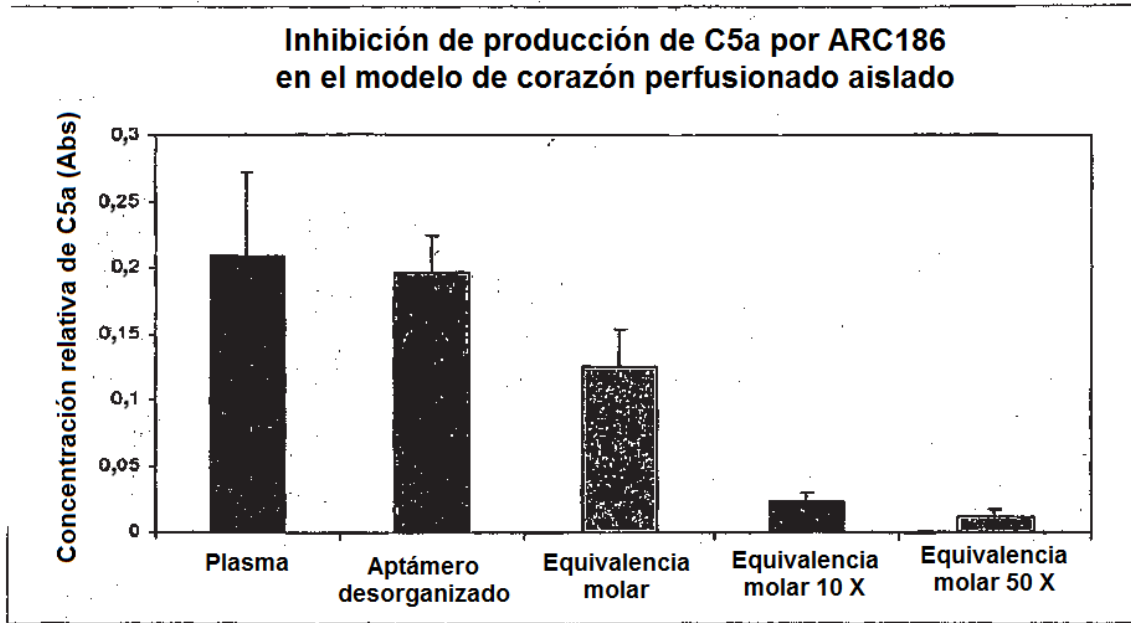




Figura 29

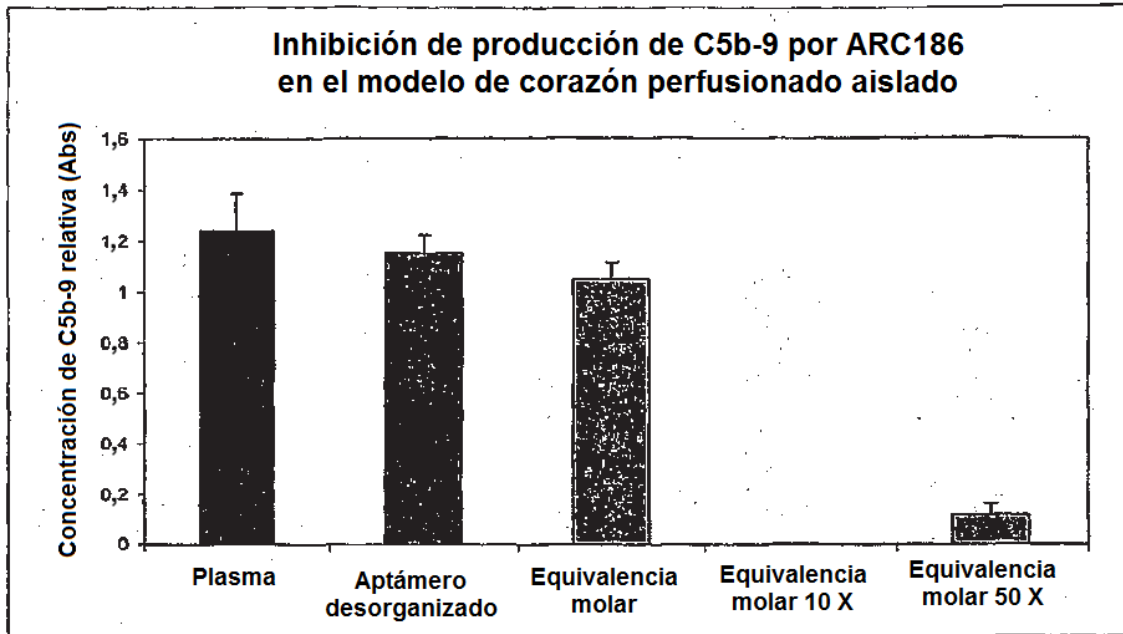


Figura 30

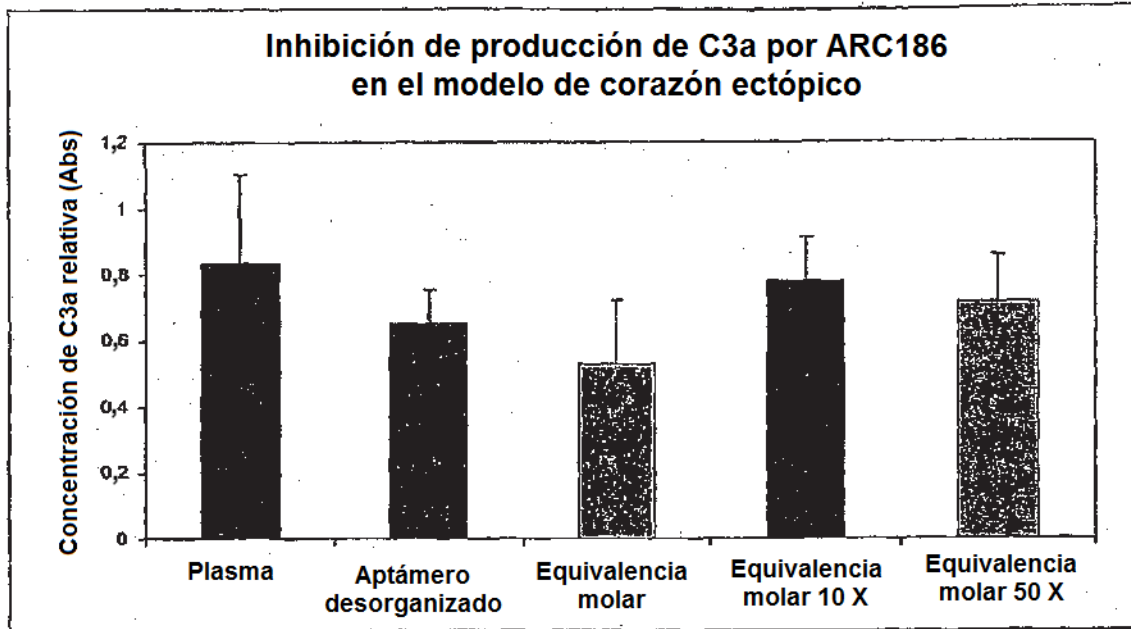


Figura 31

| Animal       | Tratamiento                            | Irrelevante | C3b | C5b-9 |
|--------------|--|-------------|-----|-------|
| 1-001 (1/26) | Ninguno                                | neg         | Pos | pos   |
| 1-002(1-26)  | Ninguno                                | neg         | Pos | pos   |
| 1-001        | Ninguno                                | neg         | Pos | pos   |
| 1-002        | Ninguno                                | neg         | Pos | pos   |
| 1-003        | Ninguno                                | neg         | Pos | pos   |
| 3-001        | Aptámero irrelevante 50 X molar        | neg         | Pos | pos   |
| 3-002        | Aptámero irrelevante 50 X molar        | neg         | Pos | pos   |
| 3-003        | Aptámero irrelevante 50 X molar        | neg         | Pos | pos   |
| 4-001        | Aptámero de C5 equivalencia molar      | neg         | Pos | pos   |
| 4-002        | Aptámero de C5 equivalencia molar      | neg         | Pos | pos   |
| 4-003        | Aptámero de C5 equivalencia molar      | neg         | Pos | pos   |
| 5-001        | Aptámero de C5 equivalencia molar 10 X | neg         | Pos | neg   |
| 5-002        | Aptámero de C5 equivalencia molar 10 X | neg         | Pos | neg   |
| 5-003        | Aptámero de C5 equivalencia molar 10 X | neg         | Pos | neg   |
| 5-004        | Aptámero de C5 equivalencia molar 10 X | neg         | Pos | neg   |
| 5-005        | Aptámero de C5 equivalencia molar 10 X | neg         | Pos | neg   |
| 6-001        | Aptámero de C5 equivalencia molar 50 X | neg         | Pos | neg   |
| 6-002        | Aptámero de C5 equivalencia molar 50 X | neg         | Pos | neg   |
| 6-003        | Aptámero de C5 equivalencia molar 50 X | neg         | Pos | neg   |
| 6-004        | Aptámero de C5 equivalencia molar 50 X | neg         | Pos | neg   |

Figura 32

| Animal | Compuesto | Suero   | Relación molar | EDP aumentado | Fallo [S o N] | Tiempo hasta el fallo |
|--------|-----------|---------|----------------|---------------|---------------|-----------------------|
| 1-001  | ARC658    | Humano  | 0              | S             | S             | 4 min 30 s            |
| 1-002  | AP.C658   | 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             | NA                    |
| 1-006  | ARC659    | Humano  | 0              | S             | S             | 8 min 30 s            |
| 1a-001 | ARC659    | 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 3 s             |
| 2-001  | ARC658    | Humano  | 1              | N             | N             | NA                    |
| 2-002  | ARC658    | Humano  | 1              | N             | N             | NA                    |
| 2-003  | ARCES8    | Humano  | 1              | N             | N             | NA                    |
| 2-004  | ARC658    | Humano  | 1              | N             | N             | NA                    |
| 3-001  | ARC658    | Humano  | 3              | N             | N             | NA                    |
| 3-002  | ARC658    | Humano  | 3              | N             | N             | NA                    |
| 3-003  | ARC658    | Humano  | 3              | N             | N             | NA                    |
| 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 | ARCS58    | 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  | ABC658    | Primate | 10             | S             | N             | NA                    |
| 7-002  | ARC658    | Primate | 10             | S             | N             | NA                    |
| 7-003  | ARC658    | Primate | 10             | S             | S             | 9 min 15 s            |
| 7-004  | ARC658    | Primate | 10             | S             | N             | NA                    |
| 9-001  | ARC658    | Primate | 20             | S             | S             | 12 min 50 s           |
| 11-001 | ARC658    | Primate | 30             | S             | N             | NA                    |
| 11-002 | ARC658    | Primate | 30             | S             | S             | 10 min 0 s            |
| 11-003 | ARC658    | Primate | 30             | S             | N             | NA                    |
| 13-001 | ARC658    | Primate | 50             | N             | N             | NA                    |
| 13-002 | ARC658    | Primate | 50             | N             | N             | NA                    |
| 13-003 | ARC658    | Primate | 50             | N             | N             | NA                    |

Figura 33

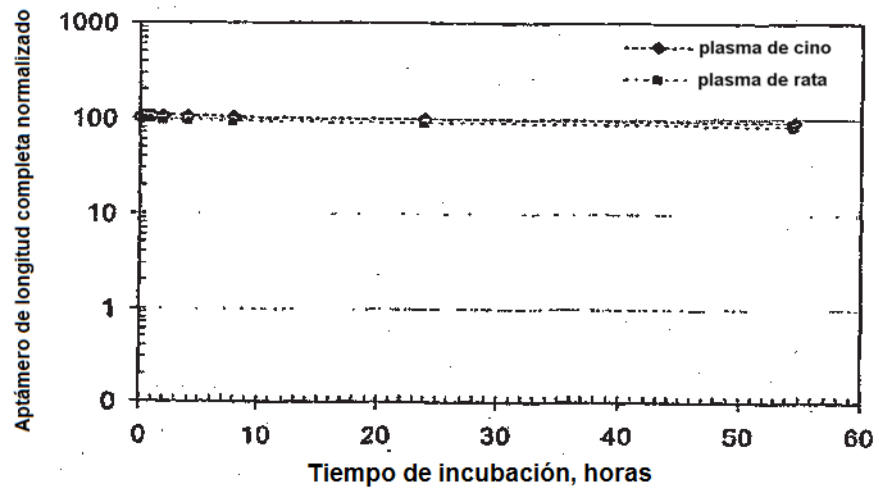


Figura 34

| Número de grupo | Número de animales | Artículo de ensayo       | Nivel de dosificación (mg/kg) | Volumen de dosis (ml/kg) | Régimen de dosificación   | Recogida de muestras   |
|-----------------|--------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|--|
| 1               | 3                  | ARC657<br>PEG de 20 kDa  | 10                            | 1                        | Bolo intravenoso el día 1 | t = antes de la dosis, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 horas |
| 2               | 3                  | ARC658<br>PEG de 30 kDa  | 10                            | 1                        | Bolo intravenoso el día 1 | t = antes de la dosis, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 horas |
| 3               | 3                  | ARC 187<br>PEG de 40 kDa | 10                            | 1                        | Bolo intravenoso el día 1 | t = antes de la dosis, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 horas |

Figura 35

| PK de Conjugados de Aptámero Anti-C5-PEG en Ratas Sprague Dawley |         |           |         |           |         |           |
|--|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|
| Aptámero   | ARC657  |           | ARC658  |           | ARC187  |           |
| Grupo de PEG   | 20 kDa  |           | 30 kDa  |           | 40 kDa  |           |
|  | MEDIA   | DESV. TIP | MEDIA   | DESV. TIP | MEDIA   | DESV. TIP |
| Tiempo (horas)   | 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   | <LIDC   | <LIDC     | 0,47    | 0,17      | 0,73    | 0,03      |
| 32   | <LIDC   | <LIDC     | <LIDC   | <LIDC     | 0,49    | 0,01      |
| 48   | <LIDC   | <LIDC     | <LIDC   | <LIDC     | 0,27    | 0,02      |

Figura 36

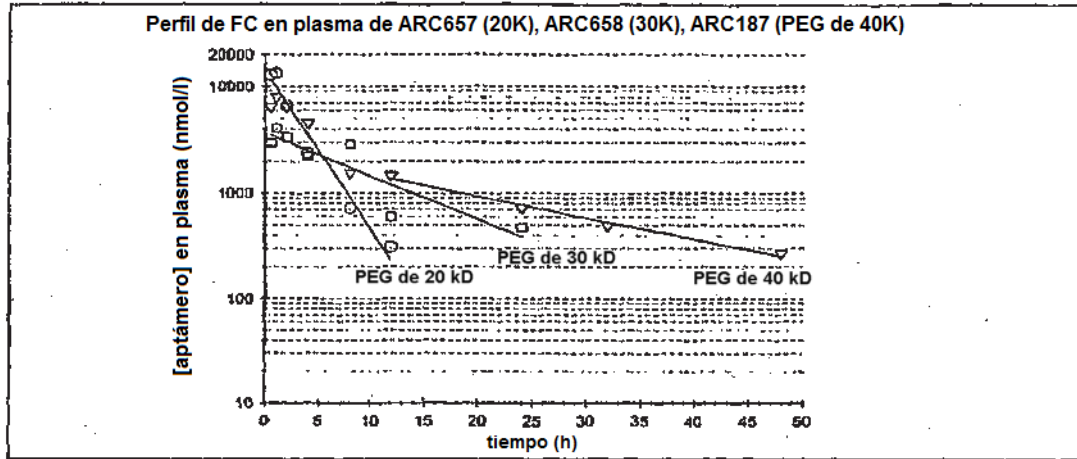


Figura 37

| Especie | Dosis (mg/kg) | Via de admin. | Grupo de PEG | C <sub>máx</sub><br>(µg/ml) | ABC <sub>0,∞</sub><br>(µg·h/ml) | t <sub>1/2</sub> (α)(h) | t <sub>1/2</sub> (β)(h) | Cl<br>(ml/min·kg) | V <sub>ss</sub> (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                     |



Figura 38A

| N° de grupo | N° de animales | Artículo de ensayo | Dosis   |         | Vía de la dosis | Recogida de muestras   |
|-------------|----------------|--------------------|---------|---------|-----------------|--|
|             |                |                    | (mg/kg) | (ml/kg) |                 |  |
| 1           | 33F            | ARC 187            | 10      | 4       | IV              | t = antes de la dosis, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72 horas |
| 2           | 33F            | ARC1905            | 10      | 4       | IV              | t = antes de la dosis, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72 horas |

Figura 38B

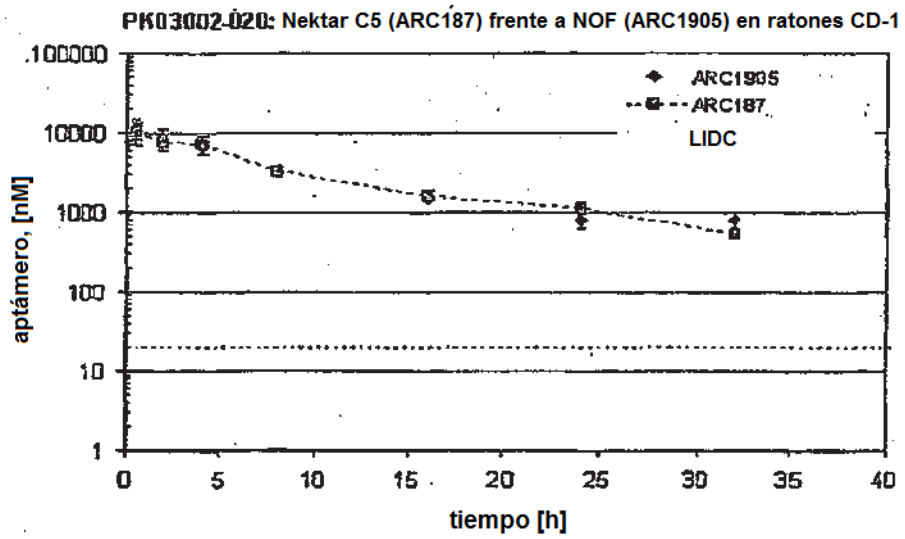


Figura 38C

| Análisis de FC no compartimental (NCA) |           |         |         |
|--|-----------|---------|---------|
| Atributo                               | Unidad    | ARC1905 | ARC 187 |
| C <sub>máx</sub>                       | μM        | 12      | 10      |
| ABC <sub>0,∞</sub>                     | μM-h      | 88      | 89      |
| MRT <sub>0,∞</sub>                     | h         | 11      | 11      |
| CL                                     | ml/min-kg | 0,15    | 0,15    |
| V <sub>ss</sub>                        | ml/kg     | 95      | 96      |
| K <sub>10</sub>                        | 1/h       | 0,151   | 0,121   |
| t <sub>1/2</sub> (K <sub>10</sub> )    | h         | 5       | 6       |

Figura 39

| Aptámero | Antes | 1 h | 3 h | 6 h |
|----------|-------|-----|-----|-----|
| ARC657   | No    | Sí  | Sí  | Sí  |
| ARC658   | No    | Sí  | Sí  | Sí  |
| ARC187   | No    | Sí  | Sí  | Sí  |

Figura 40

| Número de grupo | Número de animales | Artículo de ensayo         | Nivel de dosificación (mg/kg) | Volumen de dosis (ml/kg) | Régimen de dosificación      | Recogida de muestras   |
|-----------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| 1               | 1                  | ARC657<br>PEG de 20<br>kDa | 30                            | 3                        | Bolo intravenoso en el día 1 | t = antes de la dosis, 1, 5, 10, 15 y 30 minutos y a las 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 192 horas |
| 2               | 1                  | ARC658<br>PEG de 30<br>kDa | 30                            | 3                        | Bolo intravenoso en el día 1 | t = antes de la dosis, 1, 5, 10, 15 y 30 minutos y a las 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 192 horas |
| 3               | 1                  | ARC187<br>PEG de 40<br>kDa | 30                            | 3                        | Bolo intravenoso en el día 1 | t = antes de la dosis, 1, 5, 10, 15 y 30 minutos y a las 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 192 horas |

Figura 41

| PC de conjugados de aptámero anti-C5-PEG en macacos cinomolgos |               |               |               |
|--|---------------|---------------|---------------|
| Aptámero   | ARC657        | ARC658        | ARC187        |
| Grupo de PEG   | 20 kDa        | 30 kDa        | 40 kDa        |
|  | MEDIA         | MEDIA         | MEDIA         |
| Tiempo (horas)   | Cp ( $\mu$ M) | Cp ( $\mu$ M) | Cp ( $\mu$ M) |
| 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          |

Figura 42

| Especie | Dosis (mg/kg) | Vía de admin. | Grupo de PEG | C <sub>máx</sub> ( $\mu$ g/ml) | ABC <sub>0,∞</sub> ( $\mu$ g·h/ml) | t <sub>1/2</sub> ( $\alpha$ )/(h) | t <sub>1/2</sub> ( $\beta$ )/(h) | Cl (ml/min·kg) | V <sub>ss</sub> (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                     |

Figura 43

Figura 43a [sC5b-9] frente a tiempo

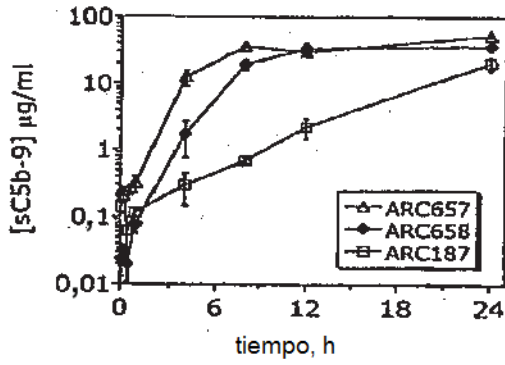


Figura 43b [sC5b-9] frente a [aptámero]

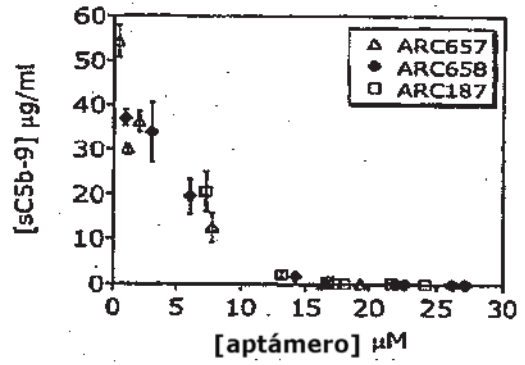


Figura 43c [C5a] frente a tiempo

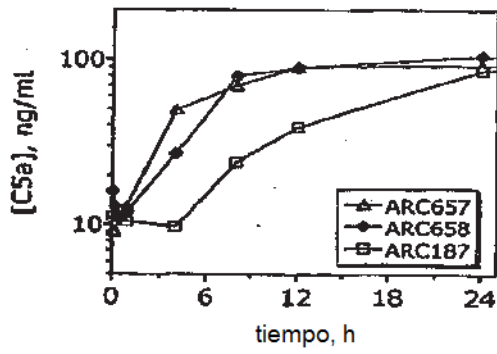


Figura 43d [C5a] frente a [aptámero]

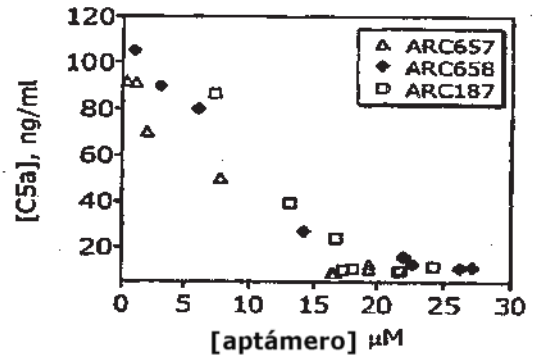


Figura 44

| Número de grupo | Número de animales | Artículo de ensayo      | Nivel de dosificación (mg/kg) | Volumen de dosis (ml/kg) | Régimen de dosificación   | Recogida de muestras   |
|-----------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|--|
| 1               | 4                  | ARC658<br>PEG de 30 kDa | 30                            | 3                        | Bolo intravenoso el día 1 | t = antes de la dosis, 1, 5, 10, 15 y 30 minutos y a las 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 192 horas |
| 2               | 4                  | ARC187<br>PEG 40 kDa    | 30                            | 3                        | Bolo intravenoso el día 1 | t = antes de la dosis, 1, 5, 10, 15 y 30 minutos y a las 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 192 horas |

Figura 45

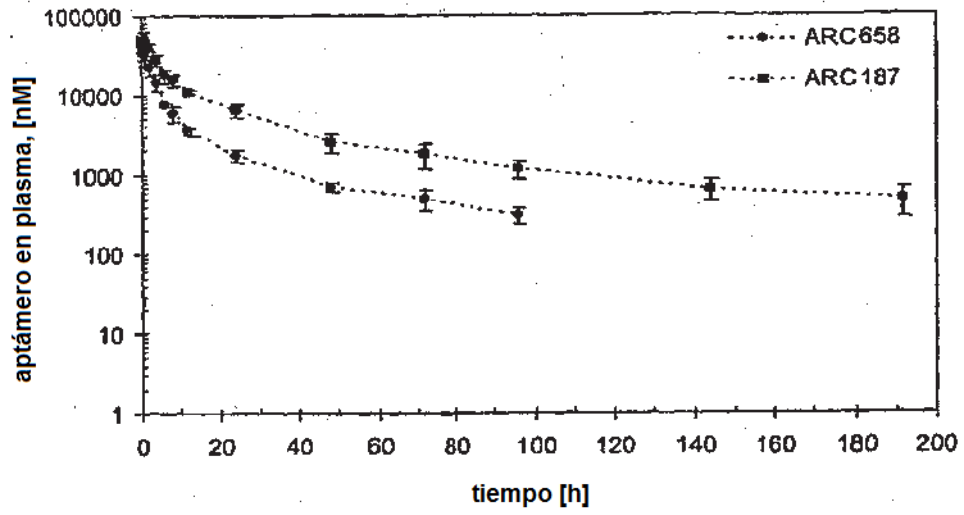


Figura 46

| Especie | Dosis (mg/kg) | Vía de admin. | Grupo de PEG | C <sub>máx</sub> (μg/ml) | ABC <sub>0,∞</sub> (μg·h/ml) | t <sub>1/2</sub> (α)/(h) | t <sub>1/2</sub> (β)/(h) | Cl (ml/min·kg) | V <sub>ss</sub> (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                     |

Figura 47

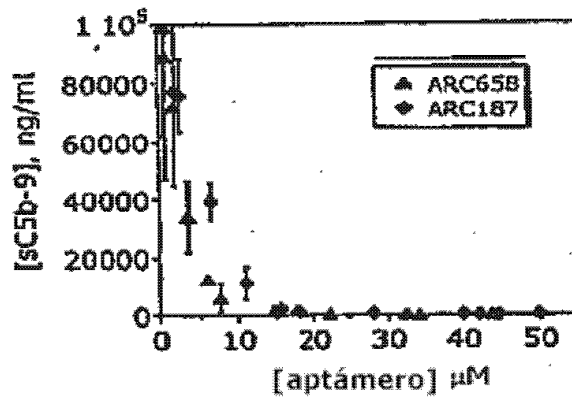


Figura 48

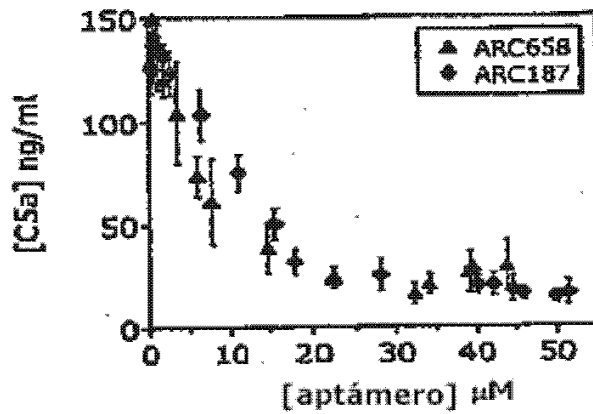




Figura 49

| Número de grupo | Número de animales | Artículo de ensayo | Nivel de dosificación (mg/kg)                  | Concentración de dosis (mg/kg) | Volumen de dosis (ml/kg)                           | Régimen de dosificación                 | Ultimo día de ensayo |
|-----------------|--------------------|--------------------|--|--------------------------------|--|---|----------------------|
| 1               | 3                  | ARCI87             | 1 mg/kg bolo IV y 0,0013 mg/kg/min infusión IV | 10                             | 0,1 ml/kg, bolo IV y 0,1872 ml/kg/día, Infusión IV | Bolo IV y 48 horas de infusión el día 1 | Día 8                |

Figura 50

| Especie | Dosis (mg/kg) | Vía de admin. | Grupo de PEG | C <sub>máx</sub> (µg/ml) | ABC <sub>0,∞</sub> (µg·h/ml) | t <sub>1/2</sub> (α)/(h) | t <sub>1/2</sub> (β)/(h) | Cl (ml/min·kg) | V <sub>ss</sub> (ml/kg) |
|---------|---------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|-------------------------|
| primate | 30            | IV            | 40 kD        | 610                      | 8061                         | 4,48                     | 53,13                    | 0,06           | 168                     |

Figura 51

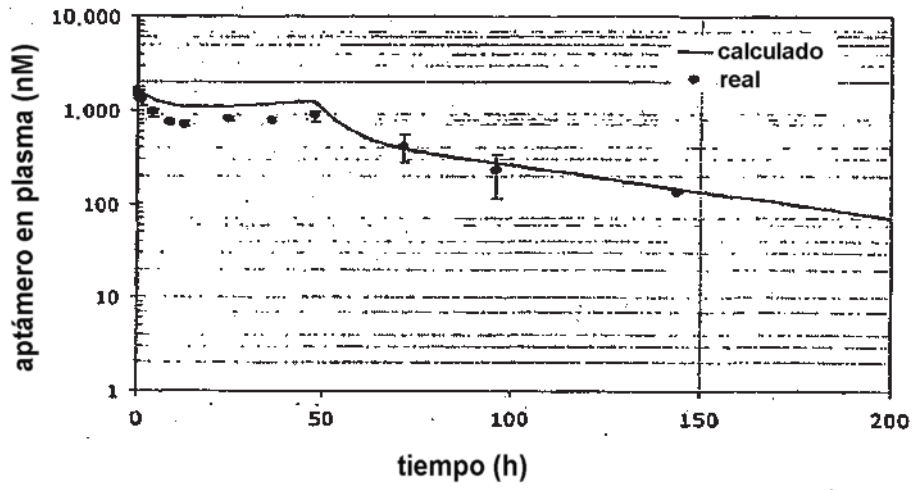


Figura 52

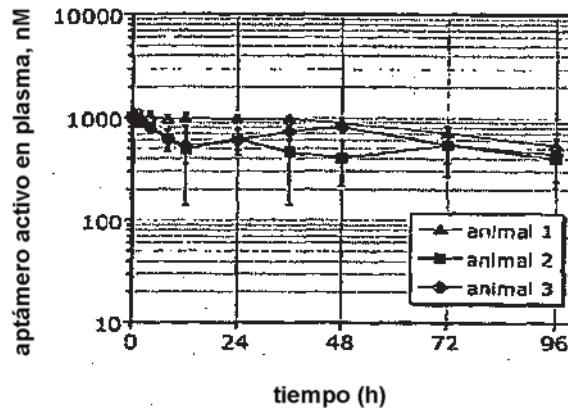


Figura 53

| Aptámero | Grupo de PEG | Peso molecular (oligo) | Peso molecular (total) | t <sub>1/2</sub> (α) (h) | t <sub>1/2</sub> (β) (h) | Dosis total (oligo) para 1,5 μM (g) |
|----------|--------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| ARC187   | 40 kDa       | 12,703                 | 52,703                 | 4,48                     | 53,13                    | 0,40                                |

Figura 54

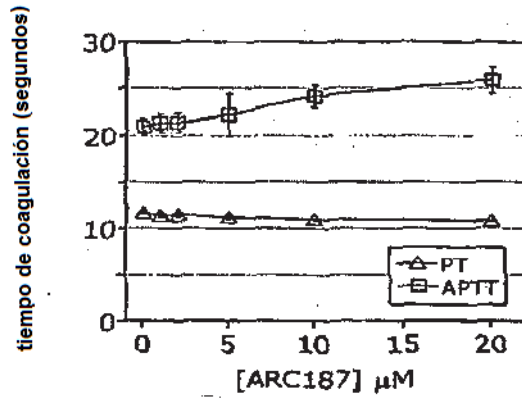


Figura 55

| Tratamiento                     | ACT (segundos)         |                        |                        |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                                 | Donante 1 <sup>a</sup> | Donante 2 <sup>b</sup> | Donante 3 <sup>b</sup> |
| inicial                         | 133 ± 30               | 145 ± 12               | 138 ± 1                |
| + heparina                      | 842 ± 95               | 519 ± 16               | 450 ± 15               |
| + heparina y ARC 187            | nd                     | 618 ± 55               | 492 ± 28               |
| + heparina y protamina          | 160 ± 11               | 155 ± 6                | 159 ± 9                |
| + heparina, protamina y ARC 187 | 200 ± 5                | 172 ± 1                | 169 ± 8                |

<sup>a</sup> 5 U/ml de heparina; <sup>b</sup> 4 U/ml heparina; nd, no determinado

Figura 56

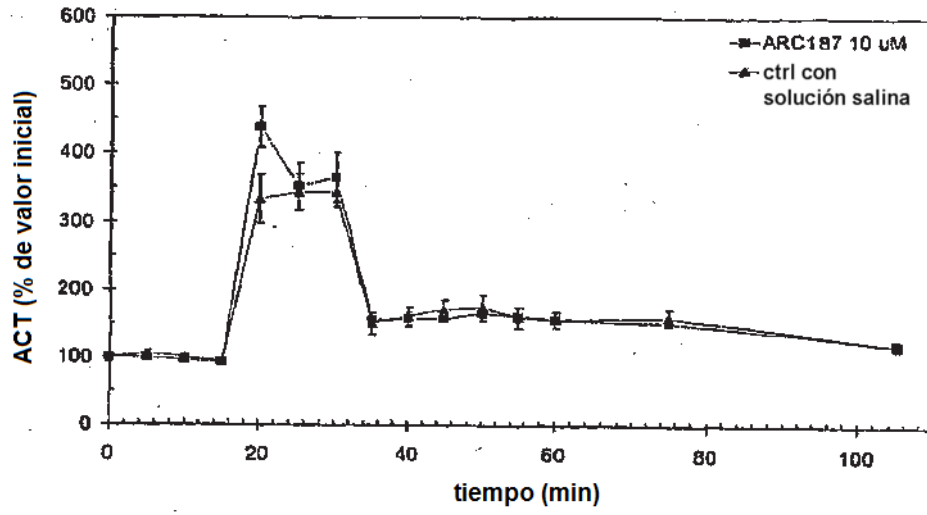


Figura 57

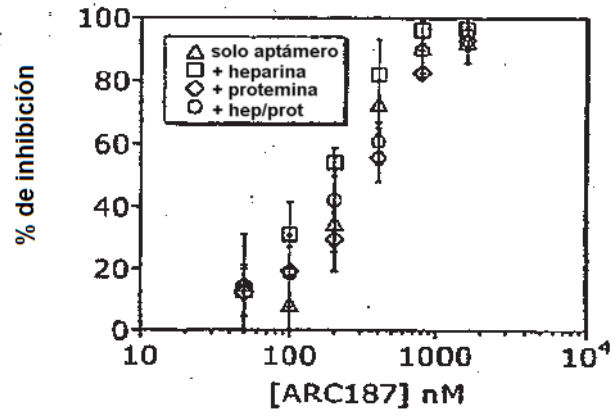


Figura 58

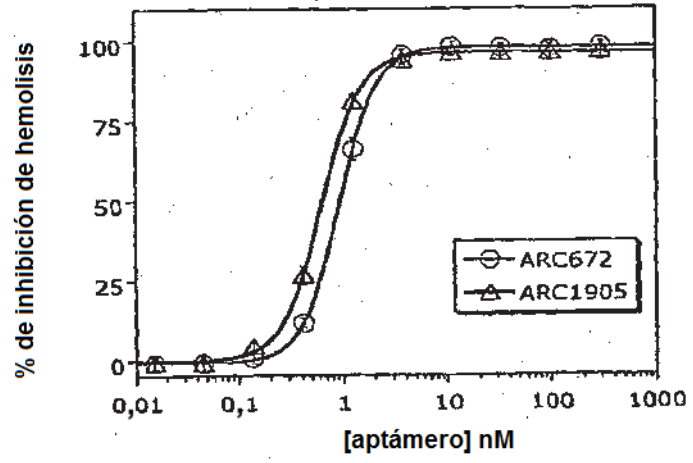




Figura 59A

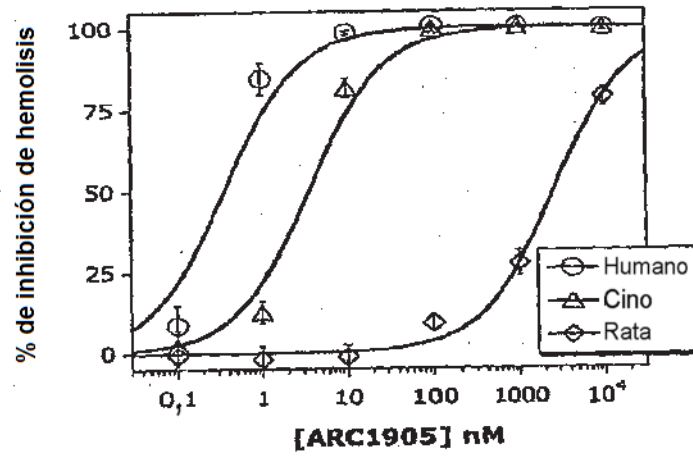


Figura 59B

| Especie de suero       | ARC1905<br>CI <sub>50</sub> (nM) | ARC127<br>CI <sub>50</sub> (nM) |
|------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Humano                 | 0,349 ± 0,0898                   | > 10.000<br>NA                  |
| Mono <i>Cynomolgus</i> | 3,69 ± 0,603                     | > 10.000<br>NA                  |
| Rata                   | 2700 ± 470                       | ~ 10.000<br>NA                  |

Figura 60

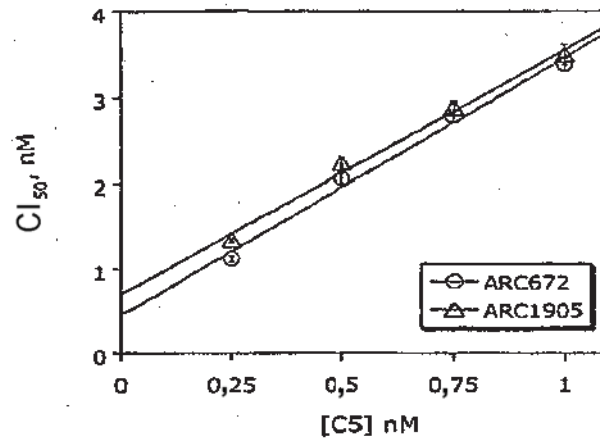


Figura 61

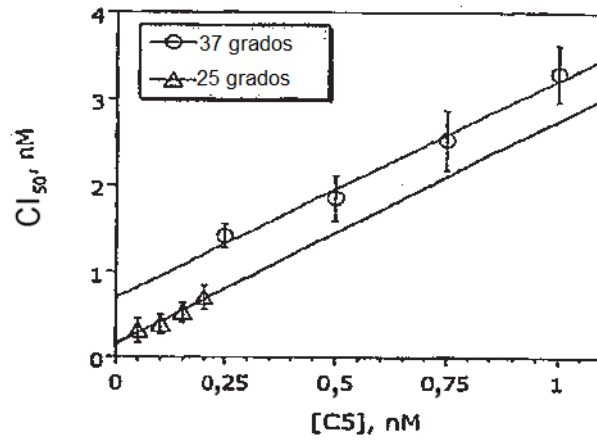


Figura 62

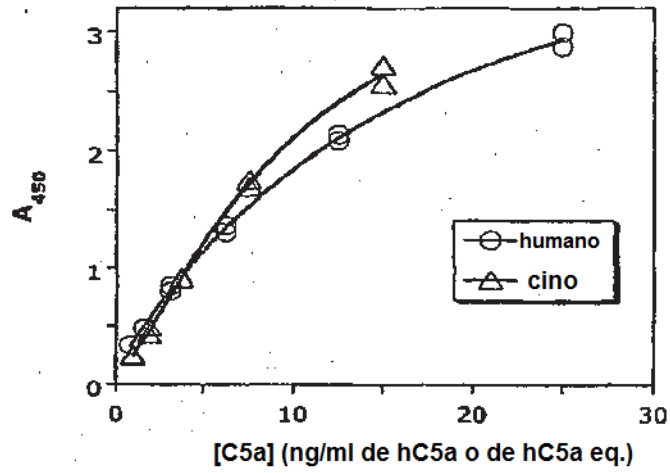


Figura 63

| Aptámero                 | CI <sub>50</sub> (nM) | CI <sub>90</sub> (nM) | CI <sub>99</sub> (nM) |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Humano                   | 196 ± 13,9            | 442 ± 23,2            | 1090 ± 198,0          |
| Macaco <i>Cynomolgus</i> | 536 ± 54,7            | 1810 ± 405,8          | 6900 ± 2600           |
| Relación cino/humano     | 2,73 ± 0,339          | 4,1 ± 0,94            | 6,4 ± 2,65            |

Figura 64

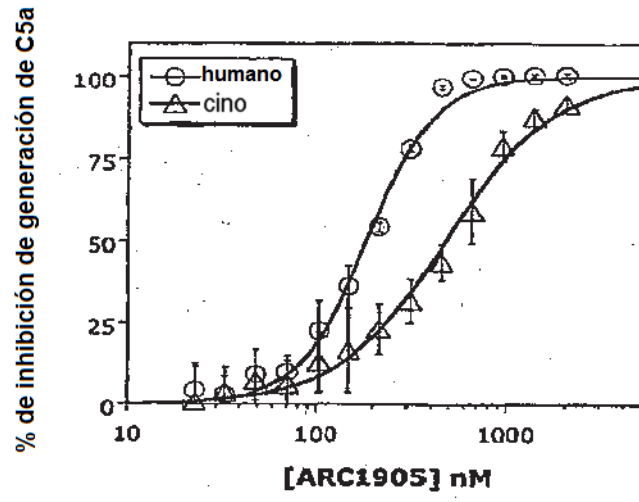


Figura 65

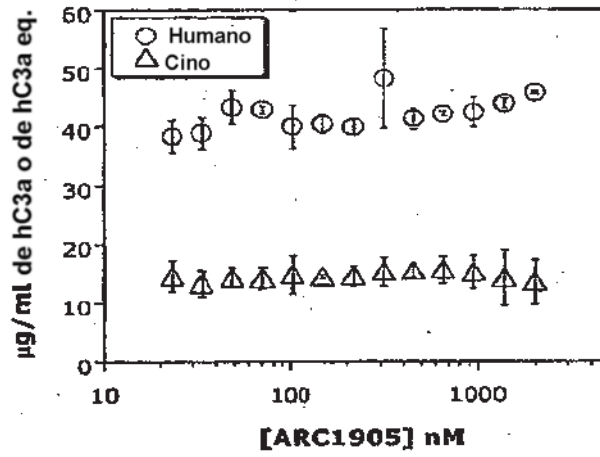


Figura 66

| Donante             | CI <sub>50</sub> (nM) | CI <sub>90</sub> (nM) | CI <sub>99</sub> (nM) |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Media de 5 donantes | 119                   | 268                   | 694                   |
| DT                  | 28,6                  | 39,2                  | 240,9                 |

Figura 67

