

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 556**

51 Int. Cl.:

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2011 PCT/CA2011/000956**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12021985**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2011 E 11817618 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2605794**

54 Título: **Complejos de quelatos de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

20.08.2010 US 375257 P

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

27.01.2017

73 Titular/es:

**REPLICOR INC. (100.0%)
6100 Royalmount Avenue Suite D-101
Montréal, Québec H4P 2R2, CA**

72 Inventor/es:

**VAILLANT, ANDREW y
BAZINET, MICHEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 598 556 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

Complejos de quelatos de oligonucleótidos

Campo técnico

5 La presente invención describe complejos de quelatos de oligonucleótidos, composiciones de los mismos y métodos para la formulación de oligonucleótidos (ON) como complejos de quelatos y se refiere al uso de estos complejos de quelatos ON para la administración de ON.

Antecedentes de la invención

10 Las sales son compuestos iónicos que resultan de la interacción (neutralización) de un ácido y una base. Las sales se componen de cationes y aniones que interactúan de modo que se mantiene un estado eléctricamente neutro. Los aniones pueden ser inorgánicos (tales como Cl⁻) u orgánicos, tales como el acetato (CH₃COO⁻). Las soluciones acuosas que contienen sales disueltas (electrolitos) son capaces de conducir la electricidad debido al estado disociado de los pares de aniones y cationes en un entorno acuoso. Los oligonucleótidos son polianiones y antes se pensaba que sólo se comportaban como sales en las que sus homólogos catiónicos existían en solución en un estado disociado.

15 La administración de ON en pacientes humanos por lo general se ha visto acompañada por varios efectos secundarios generalizados no relacionados con la secuencia de nucleótidos presente. Estos incluyen la anti-coagulación (elevación del tiempo de la protrombina o el tiempo de PTT) de la sangre (Kandmimlla et al., 1998, Bioorgan. Med. Chem. Let., 8: 2103; Sheehan et al, Blood, 1998, 92: 1617; Nicklin et al, 1197, Nucleosides & Nucleotides, 16: 1145; Kwoh, 2008, Antisense Drug Tech. 2^a edición, p 374) y reacciones del lugar de inyección o
20 ISR (induración, inflamación, sensibilidad y dolor) con la administración subcutánea (Webb et al, 1997, Lancet, 349: 9059; Schreiber et al, 2001, Gastroenterol, 120: 1339; Seawell et al, 2002, J. Pharmacol. Exp. Therap, 303: 1334; Kwoh de 2008, Antisense Drug Tech. Segunda Ed, p 383.; Raal et al., 2010, Lancet, 375: 998). Se cree que los efectos anti-coagulación están mediados por la interacción específica no de secuencia con proteínas de la cascada de coagulación. Como los ON han demostrado que poseen propiedades inmunoestimulantes (a través del receptor
25 tipo Toll o inducción de citoquinas mediada por TLR), a los ISR típicamente se les ha atribuido la exigencia de una alta concentración en la administración de ON en un pequeño volumen (por lo general de 1 cc) por vía subcutánea (SC), lo que se cree que conduce a la inflamación local en el lugar de la inyección.

30 La publicación científica "Influence of divalent cations on the conformation of phosphorothioate oligodeoxynucleotides: a circular dichroism study" de Patil and Rhodes, 2000, Nucleic Acids Research, estudia los cambios en la conformación de oligonucleótidos de fosforotioato inducida por cationes divalentes.

35 Con la llegada de la terapia basada en ácidos nucleicos en los últimos años, el aumento del número de compuestos basados en ON en desarrollo clínico ha aumentado. Históricamente, la mayoría de los regímenes de dosificación de ON han empleado dosis múltiples en dosis de una semana o únicas semanales que deben darse por vía parenteral debido a la escasa biodisponibilidad oral de los ON. Dado que la infusión intravenosa de los ON está típicamente limitada por la dosis y la velocidad por la reactividad (fiebre, escalofríos, debilidad) y sería logísticamente exigente en un escenario de administración crónica, una aplicación clínica más reciente de los ON ha utilizado la ruta (SC) de administración subcutánea. Esto conduce a efectos secundarios de dosificación sistémica mínimos pero típicamente se acompaña de reacciones en el sitio de inyección de diferentes grados de gravedad (como se describe arriba), que también limitan la dosificación alcanzable por esta ruta de administración.

40 Por tanto, sería útil y conveniente ser provisto de una formulación ON, lo que atenuaría la reactividad durante cualesquiera rutas de administración IV o SC. Por otra parte, mientras que los efectos anticoagulantes de la administración ON son considerados mínimos, también sería útil para neutralizar este efecto secundario de los ON proporcionar un mayor margen de seguridad en sujetos humanos y no humanos.

Por tanto, existe una necesidad de proporcionar una mejora en la formulación de los ON.

45 Compendio

De acuerdo con la presente descripción se describe ahora una composición farmacéutica para su uso en la supresión o reducción de las reacciones secundarias de la inyección subcutánea en un sujeto de un oligonucleótido administrado subcutáneamente, comprendiendo dicha composición farmacéutica: un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende dos o más oligonucleótidos unidos a su estructura de fosfodiéster por un catión multivalente; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde al menos un oligonucleótido de dicho complejo
50 tiene al menos un enlace fosforotioato y en donde dicho catión multivalente es un catión de metal divalente.

Se describe además una formulación de oligonucleótidos para la administración subcutánea, comprendiendo la formulación de oligonucleótidos el complejo de quelato de oligonucleótido como se describe en el presente documento.

También se describe una composición farmacéutica que comprende el complejo de quelato de oligonucleótido o la formulación de oligonucleótidos descrita en este documento y un vehículo.

5 Se describen en el presente documento métodos para la supresión o reducción de reacciones en el sitio de la inyección con la administración de ON como un complejo de quelato de calcio u otros complejos de quelato de metal de ON apropiados, la formulación de oligonucleótido descrita en el presente documento, o una composición farmacéutica descrita en este documento. En particular, el ON se administra por vía subcutánea.

10 También se describe en este documento una formulación de oligonucleótido, en el que una fuente de catión de metal divalente de cualquiera de la siguiente lista se proporciona con el oligonucleótido como un complejo de quelato de ON en el momento del uso del oligonucleótido: calcio, magnesio, cobalto, hierro, manganeso, bario, níquel, cobre y/o zinc. Por tanto, se describe en este documento una formulación de oligonucleótido que comprende calcio; una formulación de oligonucleótido que comprende magnesio; una formulación de oligonucleótido que comprende cobalto; una formulación de oligonucleótido que comprende hierro (2+); una formulación de oligonucleótido que comprende manganeso; una formulación de oligonucleótido que comprende cobre; una formulación de oligonucleótido que comprende zinc.

15 Se describen en este documento métodos para la fabricación de complejos de quelato de metal ON usando cualquiera de los siguientes cationes metálicos, individualmente o en combinación: calcio, magnesio, cobalto, hierro, manganeso, bario, níquel, cobre y/o zinc.

20 También se describe un método para la preparación del complejo de quelato de oligonucleótido tal como se describe en el presente documento, la formulación de oligonucleótido descrita en la presente memoria, o la composición farmacéutica descrita en el presente documento, comprendiendo el método disolver cualquier sal de oligonucleótido de sodio en un excipiente acuoso farmacéuticamente aceptable, y añadir gradualmente una solución de sal metálica divalente con el oligonucleótido disuelto de manera que el complejo de quelato de oligonucleótido siga siendo soluble.

25 Se describe en el presente documento un método para quelar los siguientes cationes metálicos divalentes dentro de un sujeto usando una sal de oligonucleótido de sodio: calcio, magnesio, cobalto, hierro, manganeso, bario, níquel, cobre, zinc, cadmio, mercurio, plomo, berilio, estroncio, radio y/o cualquier otro elemento de metal, metal de transición, metal posterior a la transición, lantánidos o actínidos capaces de existir en el estado de carga 2+ o 3+.

30 También se describe en este documento un método para mejorar la estabilidad de cualquier ON en solución mediante la preparación del ON como un complejo de quelato de calcio u otro complejo de quelato de metal de ON apropiado, la formulación de oligonucleótido descrita en el presente documento, o una composición farmacéutica descrita en este documento. En particular, se describe un método para estabilizar un oligonucleótido en una solución acuosa.

Se abarca en la presente memoria que el catión multivalente es un catión divalente.

Se abarca en la presente memoria que el catión divalente es un metal alcalinotérreo con un estado de carga 2+.

35 Se abarca en este documento que el catión divalente es un metal de transición o posterior a la transición de un estado de carga 2+.

Se abarca en la presente memoria que el catión divalente es un metal lantánido con un estado de carga 2+.

Se abarca en la presente memoria que el catión divalente es un metal actínido con un estado de carga 2+.

40 El catión divalente puede ser, individualmente o en combinación: calcio, magnesio, cobalto, hierro, manganeso, bario, níquel, cobre y/o zinc.

En particular, el complejo de quelato descrito en la presente memoria puede comprender dos o más diferentes cationes metálicos divalentes.

En una realización adicional, el complejo quelato comprende al menos un oligonucleótido de cadena doble.

En otra realización, el complejo quelato comprende al menos un oligonucleótido con un enlace fosforotioato.

45 El complejo de quelato también puede comprender al menos un oligonucleótido totalmente fosforotiodado.

El complejo de quelato también puede comprender al menos un oligonucleótido con una ribosa 2' modificada.

El complejo de quelato también puede comprender al menos un oligonucleótido que tiene cada ribosa 2' O-metilada.

El complejo de quelato o la formulación se adapta para la administración subcutánea.

Se abarca, además, que el oligonucleótido consiste en SEQ ID NOS: 3-14.

Se abarca, además, que la concentración del oligonucleótido disuelto es de 0,01 a 100 mg/ml antes de la adición de la sal de metal.

En particular, la relación de la sal de metal añadida al oligonucleótido disuelto puede ser 0,1 a 40 mg de la sal divalente por cada 100 mg de oligonucleótido.

5 Se abarca, además, que la concentración de oligonucleótido final es de 0,1 a 100 mg/ml.

En una realización adicional, la sal de metal es al menos una de una sal de cloruro, una sal de gluconato, una sal de citrato, una sal de lactato, una sal de malato, una sal de aspartato, una sal de fumarato, una sal de ascorbato, una sal de benzoato, una sal de eritorbato y una sal de propionato.

10 En otra realización, la solución de sal de metal contiene al menos uno de calcio, magnesio, cobalto, hierro (2+), manganeso, cobre y/o zinc.

También se abarca un complejo de quelato que es un complejo de quelato de calcio; un complejo de quelato de magnesio; o un complejo de quelato de magnesio/calcio mixto.

También se describe el uso de un catión multivalente tal como se describe en el presente documento en la fabricación de un complejo de quelato de oligonucleótido.

15 También se proporciona el uso del complejo de quelato de oligonucleótido tal como se describe en el presente documento, la formulación de oligonucleótido descrita en la presente memoria, o una composición farmacéutica descrita en este documento para suprimir o reducir las reacciones secundarias de la inyección subcutánea en un sujeto de dicho oligonucleótido administrado subcutáneamente.

20 También se proporciona el uso del complejo de quelato de oligonucleótido, tal como se describe en el presente documento, la formulación de oligonucleótido descrita en la presente memoria, o una composición farmacéutica descrita en este documento para la estabilización de un oligonucleótido en una solución acuosa.

La expresión "anti-coagulación" se entiende que significa la inhibición de la coagulación normal de la sangre o la formación de coágulos.

25 La expresión "quelación" se pretende que signifique el secuestro o la retirada de la reacción de la solución libre de un contraión (negativo o positivo) por otra molécula capaz de unirse al contra-ion, formando un complejo quelatado.

La expresión "catión metálico divalente" se pretende que signifique cualquier catión de metal que pueda existir de forma natural en el estado de carga 2 + y que incluya metales alcalinotérreos (elementos del grupo 2 de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC), metales de transición, metales de post-transición, metaloides o lantánidos.

30 La expresión "catión de metal trivalente" se pretende que signifique cualquier catión de metal que exista de forma natural en el estado de carga 3+ y que incluya metales de transición, metales de post-transición, metaloides, lantánidos o actínidos.

Breve descripción de los dibujos

A continuación se hará referencia a los dibujos que se acompañan:

35 La Fig. 1 ilustra las características físico-químicas comunes de los ON. A) Co-separación de REP 2006 y un fosforotioato ON de 21 mer con una secuencia definida por cromatografía líquida de alta resolución. B) Identificación de especies en el ON de 21 mer mediante espectroscopía de masas. C) Identificación de las especies en el REP 2006 ON mediante espectroscopía de masas.

40 La Fig. 2 ilustra la formación de complejos de quelato de ON-calcio por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de varios tamaños 6 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON degenerados marcados con fluorescencia utilizando reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP 2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID NO: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La formación de complejos de quelato de ON-calcio se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de calcio de calidad ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelato de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

50 La Fig. 3 ilustra la formación de complejos de quelato de ON-magnesio por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de varios tamaños 6 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON marcados de manera fluorescente degenerados que utilizan reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP

2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID NO: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La formación de complejos de quelato de ON-magnesio se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de magnesio de calidad ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelatos de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 4 ilustra la formación de complejos de quelato de ON-cobalto por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de varios tamaños 6 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON marcados de manera fluorescente degenerados que utilizan reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP 2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID NO: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La formación de complejos de quelato de ON-cobalto se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de cobalto de grado ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelatos de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 5 ilustra la formación de complejos de quelato de ON-hierro por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de varios tamaños 6 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON marcados de manera fluorescente degenerados que utilizan reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP 2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID NO: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO 4). La formación de complejos de quelato de ON-hierro se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de hierro de grado ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelatos de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 6 ilustra la formación de complejos de quelato de ON-manganeso por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de varios tamaños 6 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON marcados de manera fluorescente degenerados que utilizan reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP 2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID NO: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La formación de complejos de quelato de ON-manganeso se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de manganeso de grado ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelatos de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 7 ilustra la formación de complejos de quelato de ON-bario por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de varios tamaños 6 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON marcados de manera fluorescente degenerados que utilizan reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP 2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID N: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La formación de complejos de quelato de ON-bario se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de bario de grado ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelatos de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 8 ilustra la formación de complejos de quelato de ON-níquel por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de varios tamaños 6 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON marcados de manera fluorescente degenerados que utilizan reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP 2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID NO: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La formación de complejos de quelato de ON-níquel se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de níquel de grado ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelatos de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 9 ilustra la formación de complejos de quelato de ON-cobre por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de varios tamaños 6 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON marcados de manera fluorescente degenerados que utilizan reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP 2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID NO: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La formación de complejos de quelato de ON-cobre se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de cobre de grado ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelatos de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 10 ilustra la formación de complejos de quelato de ON-zinc por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de varios tamaños 6 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON marcados de manera fluorescente degenerados que utilizan reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP 2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID NO: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La formación de complejos de quelato de ON-zinc se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de zinc de grado ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelatos de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 11 ilustra la formación de complejos de quelato de ON-cadmio por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de varios tamaños 6 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON marcados de manera fluorescente degenerados que utilizan reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP 2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID NO: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La formación de complejos de quelato de ON-cadmio se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de cadmio de grado ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelatos de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 12 ilustra la formación de complejos de quelatos ON-mercurio por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de diversos tamaños 6 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON marcados de manera fluorescente degenerados que utilizan reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP 2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID NO: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La formación de complejos de quelato de ON-mercurio se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de mercurio de grado ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelatos de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 13 ilustra la formación de complejos de quelatos ON-plomo por los ON de fosforotioato degenerados marcados con fluorescencia: A) de varios tamaños 5 mer (REP 2032-FL), 10 mer (REP 2003-FL), 20 mer (REP 2004-FL), 40 mer (REP 2006-FL) y B) de ON degenerados marcados con fluorescencia utilizando reacción con fosforotio (REP 2006-FL), reacción con fosforotio + 2' O metilribosa (REP 2107-FL) o 2' O metilribosa (REP 2086-FL) y diferentes secuencias (poli C-REP 2031-FL; SEQ ID NO: 4). La naturaleza dependiente no de secuencia de la formación del complejo de quelato de ON se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, pero también se demuestra usando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La formación de complejos de quelato de ON-plomo se demostró mediante la combinación de concentraciones crecientes de cloruro de plomo de grado ACS con oligonucleótidos marcados con FITC en solución y monitorizando la formación de complejos de quelatos de oligonucleótido por un aumento en la polarización de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 14A ilustra las características químicas generales de los ON que no son dependientes de la secuencia ON. Independientemente de la secuencia, cualquier ON existe como un polímero que tiene ambas actividades hidrófobas e hidrófilas. La reacción con fosforotio (representada en la estructura química en esta figura) sirve para aumentar la hidrofobicidad del polímero ON pero no afecta a la hidrofilia. La Fig. 14B conceptualiza la naturaleza de la quelación del oligonucleótido de cationes de metal divalente y trivalente. Los cationes metálicos (representados por círculos sólidos grises) enlazan las superficies hidrófilas de los polímeros ON vía puentes de iones metálicos (representados por elipses) entre dos o tres átomos sin puente de oxígeno o azufre en los enlaces fosfodiéster.

La Fig. 15 ilustra el modelo del comportamiento en disolución de los ON en presencia de cationes de metales divalentes en diferentes ON y a concentraciones de los cationes del metal divalente. A) Bajas concentraciones de catión metálico divalente/trivalente, bajas concentraciones de ON dieron dímeros o complejos de quelatos de ON de orden inferior. B) El aumento de las concentraciones de cationes de metal divalente/trivalente producen más formación completa del complejo de quelato de ON en la solución. C) Un mayor incremento en las concentraciones de ON en presencia de metales divalentes o trivalentes son capaces de producir complejos de quelatos de ON de orden superior con el aumento de las concentraciones de metales. Todos los complejos de quelatos en (A) a (C) son solubles en solución acuosa por tener superficies hidrofílicas todavía expuestas al ambiente acuoso manteniendo así la solubilidad. D) En concentración suficiente de ON y del metal, todas las superficies hidrofílicas son ahora constreñido dentro de los complejos de quelato de ON, dejando sólo las superficies hidrofóbicas expuestas al ambiente acuoso. Esto resulta en la precipitación del complejo de quelato de ON.

La Fig. 16 ilustra el efecto del comportamiento de la solución de complejos de quelatos fluorescentes-ON sobre la polarización de fluorescencia. Con el aumento de la concentración de metal, el tamaño (y masa) de la formación del complejo de quelato de ON también aumenta (véase la Fig. 15) y, por lo tanto, se mueve con mayor lentitud en la solución. Este movimiento de rotación más lento del complejo en la solución conduce a un aumento de la polarización de fluorescencia y a un valor incrementado de mP.

La Fig. 17 muestra la formación de complejos de quelato ON con cloruro de calcio o sulfato de calcio, como se mide por la polarización de fluorescencia. A) la formación del complejo de quelato de ON con REP 2055-FL (SEQ ID NO: 6) y REP 2056-FL (SEQ ID NO: 7). B) la formación del complejo de quelato de ON con REP 2033-FL (SEQ ID NO: 5) y REP 2029-FL (SEQ ID NO: 2). Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 18 muestra la formación de complejos de quelatos ON con cloruro de calcio o sulfato de calcio, como se mide por la polarización de fluorescencia. A) ausencia de formación de complejos de quelatos de ON con REP 2028-FL y la formación del complejo de quelato de ON con REP 2057-FL (SEQ ID NO: 8). B) la formación del complejo de quelato de ON con REP-FL 2120 y 2030 REP-FL. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 19 muestra la formación de complejos de quelato ON con cloruro de calcio o sulfato de calcio, como se mide por la polarización de fluorescencia. A) la formación del complejo de quelato de ON con REP 2129-FL (SEQ ID NO: 12) y REP 2126-FL (SEQ ID NO: 9). B) la formación del complejo de quelato de ON con REP 2128-FL (SEQ ID NO: 11) y REP 2127-FL (SEQ ID NO: 10). Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 20 muestra la formación de complejos de quelato ON con cloruro de calcio o sulfato de calcio, como se mide por la polarización de fluorescencia. A) quelato ON con REP 2139-FL (SEQ ID NO: 13) y REP-2006 FL. B) la formación del complejo de quelato ON con REP 2045-FL y REP 2007-FL. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 21 muestra la formación de complejos de quelato ON con cloruro de magnesio o sulfato de magnesio según lo medido por la polarización de fluorescencia. A) la formación del complejo de quelato de ON con REP 2055-FL (SEQ ID NO: 6) y REP 2056-FL (SEQ ID NO: 7). B) la formación del complejo de quelato de ON con REP 2033-FL (SEQ ID NO: 5) y REP 2029-FL (SEQ ID NO: 12). Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 22 muestra la formación de complejos de quelato ON con cloruro de magnesio o sulfato de magnesio, según lo medido por la polarización de fluorescencia. A) ausencia de la formación de complejos en quelato ON con REP 2028-FL (SEQ ID NO: 11) y la formación de complejos de quelato ON de REP 2057-FL (SEQ ID NO: 8). B) la formación de complejos de quelato ON con REP 2120-FL y REP 2030-FL (SEQ ID NO: 3). Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 23 muestra la formación de complejos de quelato ON con cloruro de magnesio o sulfato de magnesio, según lo medido por la polarización de fluorescencia. A) la formación de complejos de quelato ON con REP 2129-FL (SEQ ID NO: 12) y REP 2126-FL (SEQ ID NO: 9). B) la formación de complejos de quelato ON con REP 2128-FL (SEQ ID NO: 11) y REP 2127-FL (SEQ ID NO: 10). Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 24 muestra la formación de complejos de quelato ON con cloruro de magnesio o sulfato de magnesio, según lo medido por la polarización de fluorescencia. A) quelato ON con REP 2139-FL (SEQ ID NO: 13) y REP-2006 FL. B) la formación de complejos de quelato ON con REP 2045-FL y REP 2007-FL. Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por duplicado.

La Fig. 25 muestra la formación de dos diferentes complejos de quelato ON bicatenarios en presencia de cloruro de calcio o cloruro de magnesio, tal como se mide por la polarización de fluorescencia. Los ON de doble cadena se prepararon mediante la hibridación de REP 2055-FL (SEQ ID NO: 6) con REP 2033-FL (SEQ ID NO: 5) y REP 2057-

FL (SEQ ID NO: 8) con REP 2056-FL (SEQ ID NO: 7). Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por triplicado.

5 La Fig. 26 muestra la formación de diversos complejos quelatos ON sólo en presencia de cationes metálicos divalentes (Mg^{2+} y Ca^{2+}) y no en presencia de cationes monovalentes (Na^+ , K^+ o NH_4^+). Los valores representan la media +/- desviación estándar de las mediciones por triplicado.

10 La Fig. 27 muestra el efecto anti-coagulación de la adición de varias concentraciones de ON de diferentes tamaños (REP 2004, REP 2006) y diferentes químicas (REP 2006, REP 2107) a la sangre humana. La forma no dependiente de la secuencia de esta interacción se demostró mediante el uso de oligonucleótidos degenerados (REP 2004, REP 2006, REP 2107) pero también se demostró utilizando un oligonucleótido específico de secuencia (REP 2031; SEQ ID NO: 4). La anti-coagulación de la sangre en presencia de estos compuestos se controló midiendo el tiempo de pro-trombina (PTT) y comparándolo con PTT en presencia de una solución salina normal en la sangre utilizando metodologías de ensayo de laboratorio clínico aceptadas. La relación de PTT en presencia y ausencia del fármaco da lugar a la relación normalizada (NR). Una NR de 1 indica la actividad normal de la coagulación de la sangre y un NR superior a 1 indica que la actividad de coagulación de la sangre se ha deteriorado (anti-coagulación).

15 La Fig. 28 muestra la supresión del efecto anti-coagulación de oligonucleótidos mediante la adición de $CaCl_2$. REP 2055 (un fosforotioato 40 mer con la secuencia $(AC)_{20}$; SEQ ID NO: 6) se añadió a la sangre a 2,5 mM, una concentración que induce una significativa anti-coagulación de la sangre. REP 2055 se combinó con diversas combinaciones de $CaCl_2$ y los efectos de cada concentración de $CaCl_2$ añadida se determinaron utilizando metodologías de ensayo de laboratorio clínico aceptadas. La anti-coagulación de la sangre en presencia de estos compuestos se controló midiendo el tiempo de pro-trombina (PTT) y comparándolo con PTT en presencia de solución salina normal en la sangre utilizando metodologías de prueba aceptadas. La relación de PTT en presencia y ausencia de fármaco produce la relación normalizada (NR). Una NR de 1 indica la actividad normal de la coagulación de la sangre y una NR superior a 1 indica que la actividad de coagulación de la sangre se ha deteriorado (anti-coagulación).

25 La Fig. 29 muestra el efecto de quelación de calcio del tratamiento de ON crónico en calcio sérico total en pacientes con enfermedad hepática crónica. Los pacientes que no recibieron suplementación mineral se muestran en (A) y los pacientes que recibieron suplementación, mientras se someten al tratamiento de ON, se muestran en (B).

Descripción detallada

30 Se describe en este documento una demostración de los cationes metálicos divalentes diversos de los quelatos ON, tales como el calcio, magnesio, cobalto, hierro, manganeso, bario, níquel, cobre, zinc, cadmio, mercurio y plomo. Se demuestra además que la quelación de estos cationes divalentes da como resultado la formación de complejos de quelato ON compuestos de dos o más ON unidos a través de cationes metálicos y que produce tal como se ejemplifica, pero no limitado a, los ON entre 6 y 80 nucleótidos de longitud, y en presencia de oligonucleótidos de fosfodiéster o fosforotioato. La quelación se produce también con oligonucleótidos que contienen o no modificaciones 2' en la ribosa. Por otra parte, la quelación de los cationes de metales no depende de la secuencia de nucleótidos presentes sino que en cambio se basa en las características fisicoquímicas comunes a todos los oligonucleótidos (véase la Fig. 14A).

40 En este documento se presenta el descubrimiento que los oligonucleótidos en soluciones acuosas que contienen cualquier catión de metal simple que sea divalente (tal como por ejemplo, pero no limitado a, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) no existen como sales, sino más bien como complejos quelados de los ON. Estos complejos se componen de dímeros de oligonucleótidos u organizaciones moleculares de orden superior en las que los ON están unidos en sus cadenas principales de fosfodiéster a través de puentes de iones de metal divalente (véase la Fig. 14B). A concentraciones específicas de ON y de cationes metálicos, estos complejos quelados son estables y solubles en solución acuosa y secuestran eficazmente cualesquiera cationes divalentes en los complejos de quelato de ON de la interacción de la solución. Esta formación de complejos de quelato también es probable que ocurra con cationes metálicos simples con una carga de 3+ o mayor (tal como se representa en la Fig. 14B). Por lo tanto, los ON funcionan como quelatos de cationes divalentes y no forman sales con cationes divalentes.

45 Es importante destacar que la formación de complejos de quelato de oligonucleótido no se produce con cationes monovalentes tales como Na^+ , K^+ o NH_4^+ y, por lo tanto, es poco probable que no ocurra con cualquier catión monovalente. Por lo tanto, la expresión "sal de oligonucleótido" está específicamente limitada solamente a las sales de oligonucleótidos con cationes monovalentes o con cationes que no forman complejos de quelatos con oligonucleótidos y se usa incorrectamente para describir oligonucleótidos existentes en solución o en forma de polvo con cationes metálicos divalentes (o incluso cationes trivalentes de metales).

55 El estándar en la técnica enseña claramente la administración de ON sólo como sales de sodio. Esto se ejemplifica por la administración de numerosos oligonucleótidos en ensayos clínicos como sales de sodio, que incluyen Fomivirsen (ISIS 2922), Mipomersen (ISIS 301012), Trecovirsen (GEM 91), Custirsen (OGX-011/ISIS 112989), Genasense (G3139) y Aprinocarsem (ISIS 3531/LY 900003) (Geary et al., 2002, Clin. Pharmacokinetics, 41: 255-260; Yu et al., 2009, Clin. Pharmacokinetics, 48: 39-50; Sereni et al., 1999, J. Clin. Pharmacol, 39: 47-54; Chi et al.,

2005, J. Nat. Canc. Inst., 97: 1287-1296; Marshall et al., 2004, Ann. Oncol., 15: 1274-1283; Grossman et al, 2004, Neuro-Oncol., 6: 32-40).

5 También se describe que la anti-coagulación de la sangre por oligonucleótidos está causada por la quelación de calcio por oligonucleótidos, como se muestra por la inversión de la anti-coagulación inducida por oligonucleótido por la restauración del calcio libre normal en la sangre mediante la adición de cloruro de calcio.

10 También se proporciona en este documento una demostración de que las reacciones en el lugar de inyección observadas con inyecciones subcutáneas de oligonucleótidos (induración, inflamación, sensibilidad y dolor) se deben, al menos en parte, a la quelación local del calcio y, posiblemente, a otros cationes divalentes tales como magnesio en el sitio de inyección por oligonucleótidos, como se muestra por la inhibición de las reacciones en el lugar de inyección (ISR) por la inyección de ON preparado como un complejo de quelato de calcio.

15 La polarización de fluorescencia es un método común utilizado para examinar las interacciones intermoleculares. En esta técnica, el cebo (es decir, cualquier ON) se marca con un marcador fluorescente (por ejemplo, FITC). En solución, la molécula de cebo cae libremente en solución debido al movimiento browniano que resulta en una mala emisión de fluorescencia polarizada cuando el cebo se somete a excitación con la longitud de onda correcta de la luz. Con un ligando de peso molecular suficiente (al menos el mismo tamaño que el cebo), la interacción entre el cebo y el ligando presenta una inhibición sustancial del volteo del complejo en solución. Como resultado de este volteo inhibido en solución, la emisión de fluorescencia se polariza de manera significativa tras la excitación. Así, con esta técnica, las interacciones pueden ser medidas en solución sin limitaciones físicas en cada pareja de unión. La polarización de fluorescencia se expresa como la mP adimensional, que es directamente proporcional a la fracción de moléculas de cebo unidas en la reacción. Por ejemplo, si una fracción muy pequeña de moléculas de cebo se unen por un ligando particular, habría muy poco de polarización de fluorescencia y los valores de mP en consecuencia serían pequeños. En el otro extremo del espectro, si una gran proporción de moléculas de cebo se unieran por un ligando particular (o con una mayor concentración de ligando), no habría polarización de fluorescencia sustancial y en consecuencia grandes valores de mP. De esta manera, las isotermas de unión para interacciones particulares de cebo-ligando se pueden generar mediante la variación de las concentraciones de ligando en presencia de una cantidad fija de cebo marcada fluorescentemente.

20 En este documento se emplean diversos ON marcados con fluorescencia para examinar su formación de complejos en presencia de cationes monovalentes y bivalentes. Aunque el seguimiento de la formación de complejos por la polarización de fluorescencia requiere que estos ON estén marcados fluorescentemente, este marcador se fija al ON en el extremo 3' a fin de no interferir ni con la base nitrogenada ni con el esqueleto del fosfodiéster del ON en cuestión. Además, el marcador fluorescente se mantiene lejos del ON por un enlazador de carbono de 3 rígido para excluir cualquier perturbación del comportamiento normal en solución. Así, cualquier formación del complejo ON observada en el presente documento usando polarización de fluorescencia con un ON marcado con fluorescencia es una representación exacta del comportamiento de la solución de ON sin marcar (ya sea complejo o no).

35 El término oligonucleótido (ON) se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (RNA) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN) y/o análogos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases de origen natural, azúcares y uniones de internucleosídico covalentes (estructura), así como oligonucleótidos que tienen porciones no de origen natural que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos a menudo se prefieren respecto a las formas nativas debido a que tienen propiedades deseables tales como, por ejemplo, la captación celular mejorada, afinidad aumentada para el ácido nucleico diana y una mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

45 En la presente solicitud, la expresión "oligonucleótido degenerado" se pretende que signifique un oligonucleótido monocatenario que tiene una oscilación (N) en cada posición, tal como NNNNNNNNNN. Cada base se sintetiza como una oscilación tal que este ON en realidad existe como una población de diferentes secuencias generadas al azar de la misma longitud y propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, para un 40 bases de longitud degeneradas de ON, cualquier secuencia particular en la población sería teóricamente representada sólo por $1/4^{40}$ o $8,3 \times 10^{-25}$ de la fracción total. Teniendo en cuenta que $1 \text{ mol} = 6,022 \times 10^{23}$ moléculas, y el hecho de que ninguna síntesis de degenerados ha superado 2 mmoles hasta la fecha, cualquier oligonucleótido con una secuencia específica presente de manera efectiva no existe más de una vez en cualquier preparación. Por lo tanto, cualquier formación de complejos observada en tal preparación debe ser debida a las propiedades fisicoquímicas no dependientes de la secuencia (o independiente de la secuencia) de los oligonucleótidos ya que cualquier oligonucleótido particular de una secuencia definida, siendo único en la preparación, no se puede esperar que contribuya a ninguna actividad derivada de su secuencia de nucleótidos específica.

55 Como una ilustración adicional de este concepto, el Ejemplo I compara la caracterización de REP 2006 (un mer 40 de ON con una secuencia fosforotioada degenerada) con un 21 mer de una secuencia definida por cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas y muestra claramente que cualquier ON con un tamaño similar y modificación química (es decir, reacción con fosforotio) tendrá características fisicoquímicas muy similares (si no idénticas) que no estarán afectadas por la secuencia de nucleótidos presentes.

Los oligonucleótidos pueden incluir diversas modificaciones, por ejemplo, modificaciones estabilizantes, y por lo tanto pueden incluir al menos una modificación en el enlace fosfodiéster y/o en el azúcar, y/o en la base. Por ejemplo, el oligonucleótido puede incluir, sin limitación, uno o más enlaces fosforotioato, enlaces de fosforoditioato, y/o enlaces metilfosfonato. Diferentes enlaces modificados químicamente compatibles se pueden combinar, por ejemplo, modificaciones en las condiciones en las que las síntesis sean químicamente compatibles. Mientras que los enlaces modificados son útiles, los oligonucleótidos pueden incluir enlaces fosfodiéster donde las propiedades físico-químicas generales del polímero de oligonucleótido no se vean sustancialmente afectadas. Modificaciones útiles adicionales incluyen, sin limitación, las modificaciones en la posición 2' del azúcar, tales como modificaciones de 2'-O-alquilo, tales como modificaciones 2'-O-metilo, modificaciones de 2'-amino, modificaciones de 2'-halo tal como 2'-fluoro; análogos de nucleótidos acíclicos. Otras modificaciones son también conocidas en la técnica y se pueden utilizar tales como el bloqueo de ácidos nucleicos. En particular, el oligonucleótido ha modificado los enlaces a lo largo de, por ejemplo, fosforotioato; tiene un 3'- y/o 5'-cap; incluye una unión 3'-5' terminal; el oligonucleótido es o incluye un concatémero que consta de dos o más secuencias de oligonucleótidos unidas por un enlazador(es).

También se proporciona una composición farmacéutica de ON en la que se previene la anti-coagulación inducida por el oligonucleótido usando una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de quelato de oligonucleótido farmacológicamente aceptable como se describe en el presente documento preparado usando cualquiera de los siguientes cationes metálicos: calcio, magnesio, cobalto, manganeso, hierro, cobre, y/o zinc. El complejo de quelato ON también se puede preparar usando dos o más cationes diferentes como se describe anteriormente. En particular, las composiciones farmacéuticas están aprobadas para la administración a un ser humano, o un animal no humano tal como un primate no humano.

También se proporciona una composición farmacéutica de ON que previene la reacción en el lugar de la inyección con una administración subcutánea que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de quelato ON farmacológicamente aceptable como se describe en el presente documento preparado mediante cualquiera de los siguientes cationes metálicos: calcio, magnesio, cobalto, manganeso, hierro, cobre, y/o zinc. El complejo de quelato ON también se puede preparar usando dos o más cationes diferentes como se describe anteriormente. En particular, las composiciones farmacéuticas están aprobadas para la administración a un ser humano, o un animal no humano tal como un primate no humano.

También se proporciona una composición farmacéutica ON con mejor tolerabilidad de infusión IV que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de quelato ON farmacológicamente aceptable preparó utilizando cualquiera de los siguientes cationes metálicos: calcio, magnesio, cobalto, manganeso, hierro, cobre y/o zinc. El complejo de quelato ON también se puede preparar usando dos o más cationes diferentes como se describe anteriormente. En particular, las composiciones farmacéuticas están aprobadas para la administración a un ser humano, o un animal no humano tal como un primate no humano.

También se proporciona una composición farmacéutica ON que previene la deficiencia inducida por el oligonucleótido de calcio, magnesio, hierro, manganeso, cobre o zinc utilizando una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de quelato ON farmacológicamente aceptable usando cualquiera de los siguientes cationes metálicos: calcio, magnesio, cobalto, manganeso, hierro, cobre, y/o zinc. El complejo de quelato ON también se puede preparar usando dos o más cationes diferentes como se describe anteriormente. En particular, las composiciones farmacéuticas están aprobadas para la administración a un ser humano, o un animal no humano tal como un primate no humano.

También se proporciona una composición farmacéutica ON con estabilidad de almacenamiento mejorada que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de quelato ON farmacológicamente aceptable usando cualquiera de los siguientes cationes metálicos: calcio, magnesio, cobalto, manganeso, hierro, cobre y/o zinc. El complejo de quelato ON también se puede preparar usando dos o más cationes diferentes como se describe anteriormente. En particular, las composiciones farmacéuticas están aprobadas para la administración a un ser humano, o un animal no humano tal como un primate no humano.

También se describe una composición farmacéutica ON con baja semivida en suero o interacción reducida con proteínas de suero que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de quelato ON farmacológicamente aceptable usando cualquiera de los siguientes cationes metálicos: calcio, magnesio, cobalto, manganeso, hierro, cobre y/o zinc. El complejo de quelato ON también se puede preparar usando dos o más cationes diferentes como se describe anteriormente. En particular, las composiciones farmacéuticas están aprobadas para la administración a un ser humano, o un animal no humano tal como un primate no humano.

Además, las composiciones anteriores pueden incluir vehículos fisiológicamente y/o farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, vehículos y/o excipientes. Las características del vehículo pueden depender de la ruta de administración. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable, adyuvante, portador y/o excipiente" se refiere a un vehículo, adyuvante, portador o excipiente que se puede administrar a un sujeto, incorporado en una composición de la presente invención, y que no destruye la actividad farmacológica en éste. Vehículos farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, portadores y excipientes que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de administración de fármacos auto-emulsionantes ("SEDDS"),

5 tensioactivos usados en formas de dosificación farmacéuticas tales como Tweens u otras matrices de suministro poliméricas similares, proteínas de suero tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, fosfato ácido de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Ciclodextrinas tales como α -, β -, y γ -ciclodextrina, o derivados químicamente modificados tales como hidroxialquilciclodextrinas, incluyendo 2- y 3-hidroxiopropil-beta-ciclodextrinas, u otros derivados solubilizados se pueden usar también para mejorar la entrega de las composiciones de la presente invención.

10 Las composiciones descritas en este documento pueden contener otros agentes terapéuticos como se describe a continuación, y pueden formularse, por ejemplo, mediante el empleo de vehículos sólidos o líquidos convencionales o diluyentes, así como aditivos farmacéuticos de un tipo apropiado al modo de administración deseado (por ejemplo, excipientes, aglutinantes, conservantes, estabilizantes, aromatizantes, etc.) de acuerdo con técnicas tales como las bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica.

15 Las presentes composiciones pueden, por ejemplo, ser administradas en una forma adecuada para liberación inmediata o liberación prolongada. La liberación inmediata o liberación prolongada se puede lograr por el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas o, particularmente en el caso de la liberación prolongada, por el uso de dispositivos tales como implantes subcutáneos o bombas osmóticas.

20 La cantidad eficaz de un compuesto descrito en el presente documento puede ser determinada por cualquier experto ordinario en la técnica, e incluye cantidades de dosificación ejemplares para un ser humano adulto de aproximadamente 0,1 a 500 mg/kg de peso corporal del compuesto activo por día, que puede ser administrada en una sola dosis o en forma de dosis divididas individuales, tales como de 1 a 5 veces por día. Se entenderá que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier sujeto particular puede variar y dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de acción de ese compuesto, la especie, edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, el modo y tiempo de administración, la velocidad de excreción y el aclaramiento, la combinación de fármacos y la gravedad de la afección particular. Los sujetos preferidos para el tratamiento incluyen animales, más preferentemente especies de mamíferos tales como seres humanos, y animales domésticos tales como perros, gatos y similares, sujetos a trastornos asociados angiogénicos dependientes o angiogénicos.

25 La composición farmacéutica también puede contener otros factores activos y/o agentes que mejoran la actividad. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para la administración pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos, polvos y aerosoles. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. Otras formulaciones incluyen aquellas en las que los ON se mezclan con un agente de administración tópica tales como, por ejemplo, lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidil colina DMPC, diestearoilfosfatidil colina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoiltetrametilaminopropil DOTAP, dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA) y otros agentes de administración o moléculas. Los ON se pueden encapsular dentro de liposomas o pueden formar complejos de los mismos, en particular los liposomas catiónicos. Alternativamente, los ON pueden completarse a los lípidos, en particular, a los lípidos catiónicos. Los ácidos grasos preferidos y ésteres incluyen, pero no se limitan a ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleina, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un éster de alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo, miristato de isopropilo IPM), monoglicérido, diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente descripción se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo I

50 Caracterización de degenerados de ON

La Fig. 1A detalla la separación por HPLC (utilizando una columna hidrofóbica) de dos preparaciones de oligonucleótidos que son co-inyectadas en la columna a la vez. La primera de ellas es el llamado patrón interno y es un oligonucleótido de fosforotioato de 21 mer con una secuencia definida específica, la segunda es REP 2006 (un oligonucleótido de fosforotioato de 40 mer degenerado). Ambas especies se separan en distintos picos definidos basados sólo en sus propiedades físico-químicas (es decir, el tamaño y la hidrofobicidad); la secuencia de nucleótidos presentes en cada uno de estos ON no tiene un impacto significativo en sus propiedades físico-químicas y, por tanto, no tiene impacto en su separación. Como tal, el patrón interno se eluye de la columna como un pico bien definido con tiempo de retención menor en comparación con REP 2006, sólo se debe a la diferencia en el tamaño de estos dos polímeros ON. Téngase en cuenta que los hombros a cada lado del pico REP 2006 se deben a

secuencias de fallo típicas en la producción de oligonucleótidos más largos. A pesar de la naturaleza heterogénea de la secuencia de REP 2006, se resuelve de manera similar como un pico bien definido por HPLC que la secuencia específica de 21 mer que ilustra las propiedades fisicoquímicas comunes de todas las especies en la preparación REP 2006, a pesar de que hay un número muy grande de diferentes secuencias presentes. Después de la separación por HPLC de los picos REP 2006 y 21-mer, estos pueden ser sometidos a espectroscopia de masas (MS) para identificar las especies presentes dentro de estos picos definidos (Figs. 1B y 1C).

En la fig. 1B, el 21 mer se resuelve en una sola especie con PM 7.402,6 Da, consistente con este PS-ON que tiene una secuencia definida. Sin embargo, el análisis MS de REP 2006 (Fig. 1C) revela un número extremadamente grande de especies presentes cuyo rango de masas tiene una distribución normal casi perfecta, de acuerdo con su naturaleza completamente degenerada. Este rango de masas va de C₄₀ (la especie más pequeña) a A₄₀ (la especie más grande) y la prevalencia de estas especies son extremadamente pequeñas, con el número de especies en aumento (intensidad máxima) cuando su masa se acerca al centro del rango de masas. Esto se debe a que un número cada vez mayor de diferentes secuencias resultará en una masa similar. El hecho de que todas las especies ON diferentes presentes en REP 2006 tendrán el mismo tiempo de retención en una columna hidrófoba durante la separación por HPLC demuestra claramente que todos los ON del mismo tamaño y con las mismas modificaciones químicas (es decir, reacción con fosforotio) tendrán propiedades fisicoquímicas muy similares (si no idénticas) y, como tal, puede considerarse funcionalmente similares en cualquier aplicación o propiedad que no dependa de la secuencia de nucleótidos presentes en una molécula ON particular. Por lo tanto, cualquier formación de complejo de quelato ON observado con cualquier ON degenerado particular, (por ejemplo, REP 2003, REP 2004), no puede depender de la secuencia de oligonucleótidos presente y debe depender de las propiedades fisicoquímicas conservadas de cualquier ON.

Ejemplo II

Los ON forman complejos de quelatos con diversos cationes metálicos divalentes

La interacción de sales de amonio de oligonucleótidos con diversos cationes de metal divalente se examinó mediante polarización de fluorescencia (FP) como se describe anteriormente. Durante la síntesis de oligonucleótidos, cada oligonucleótido fue conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en el extremo 3' por un enlazador rígido 3 de carbono utilizando reactivos bien establecidos y protocolos de síntesis. Estos oligonucleótidos se escindieron de la síntesis y quedaron como sales de amonio. Los oligonucleótidos utilizados en este ejemplo se describen en la Tabla 1.

Tabla 1
ON utilizados en el Ejemplo II

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Modificaciones
REP 2032-FL	N ₆	PS
REP 2003-FL	N ₁₀	PS
REP 2004-FL	N ₂₀	PS
REP 2006-FL	N ₄₀	PS
REP 2107-FL	N ₄₀	PS + 2' O Me
REP 2086-FL	N ₄₀	2' O Me
REP 2031-FL	C ₄₀ (SEQ ID NO: 4)	PS

N = secuencia degenerada (incorporación aleatoria de A, G, C o T)

PS = reacción con fosforotio en cada enlace

2' O Me = 2' O metilación en cada ribosa

Los oligonucleótidos 3' FITC marcados utilizados fueron REP-2032 FL (un mer 6 de oligodesoxinucleótido degenerado fosforotioado), REP-2003 FL (10 mer de oligodesoxinucleótido degenerado fosforotioado), REP-2004 FL (20 mer de oligodesoxinucleótido degenerado fosforotioado), REP 2006-FL (un mer 40 de oligodesoxinucleótido degenerado fosforotioado), REP 2031-FL (un 40 mer de oligodesoxinucleótido fosforotioado de poli citosina; SEQ ID NO: 4), REP 2107-FL (un 40 mer de oligonucleótido degenerado fosforotioado con cada ribosa modificada por 2' O metilación) y REP-2086 FL (un 40 mer de oligonucleótido degenerado fosforotioado que tiene cada ribosa modificada por 2' O metilación). Cada uno de estos ON se preparó como una solución madre 0,5 mM en TRIS 1 mM (pH 7,2). Estas soluciones madre se usaron para preparar soluciones de ON fluorescentes 3 nM en tampón FP (TRIS 10 mM, NaCl 80 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM y 0,1% de Tween®-20). EDTA estaba presente

para eliminar cualesquiera metales divalentes presentes en la solución antes de las mediciones de FP. Cada una de estas soluciones tampón también contenía NaCl 80 mM para evaluar la formación del complejo ON en presencia de un exceso molar de cationes monovalentes (en cada gráfica en las Figs. 2 a 13 se denota como la concentración de cloruro de metal 0 mM). A cada ON fluorescente en solución se añadieron diversas cantidades de sales de cloruro de grado ACS de metales divalentes (2+). Estas sales incluyen cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de manganeso, cloruro de bario, cloruro de níquel, cloruro de cobre, cloruro de zinc, cloruro de cadmio, cloruro de mercurio y cloruro de plomo. La formación de dímeros o complejos de quelatos de orden superior ON se controló mediante un aumento de la polarización de la fluorescencia (cuantificada por la unidad adimensional "mP"), de modo que el aumento de la formación de complejos de quelato ON dio lugar a cambios más grandes en la masa. El movimiento de rotación más lento resultante de estos complejos de quelato ON en solución conduce a un aumento de la polarización de la fluorescencia emitida (véase la Fig. 16). Los resultados de estos experimentos se presentan en las Figs. 2-13. En cada caso, se observaron aumentos significativos en la polarización de fluorescencia con todos los ON en presencia de todos los cationes divalentes, pero no en presencia de un exceso molar alto de Na⁺ (suministrado como NaCl), lo que indica la formación de complejos de quelato ON con solamente cationes metálicos divalentes .

Estos resultados demuestran lo siguiente:

- Los ON en presencia de NaCl 80 mM no exhiben ninguna formación detectable de dímeros o cualesquiera otros complejos de orden superior.

Los ON forman dímeros y complejos de orden superior en presencia de los siguientes cationes metálicos divalentes cuando existen en el estado de carga 2+: calcio, magnesio, cobalto, hierro, manganeso, bario, níquel, cobre, zinc, cadmio, mercurio y plomo. La formación de estos complejos ON implica la interacción de los ON con estos cationes de metales divalentes.

- La formación de complejos ON no puede ser debida a la hibridación entre las bases nitrogenadas vía las interacciones de Watson-Crick tradicionales, debido a la naturaleza degenerada de los ON probados. Además, REP 2031 (SEQ ID NO: 4) no puede auto-hibridarse bajo las condiciones experimentales empleadas.

- La formación de complejos ON es estable y soluble en solución acuosa y ya que estos complejos parecen incorporar el metal divalente en cuestión como parte del complejo formado, estos complejos ON tienen el efecto de quelar el metal divalente en cuestión de la solución en la que el complejo ON se formó.

- La quelación de estos metales y la formación del complejo de quelato ON no es dependiente de una secuencia de nucleótidos particular, como se evidencia por la quelación observada con oligonucleótidos degenerados, y tampoco depende de las modificaciones de nucleótidos que implican modificación de la unión fosfodiéster o del resto 2' ribosa.

- La quelación de estos metales se produce con oligonucleótidos de 6-40 nucleótidos de longitud.

- La quelación de estos metales tiene lugar en presencia o ausencia de la reacción con fosforotio o la modificación de 2' ribosa.

La formación expansiva de complejos de quelatos ON con muchos otros cationes metálicos divalentes con todos los ON en este ejemplo también sugiere lo siguiente:

- Debido a que los cationes divalentes catalizan la formación de complejos ON y los cationes monovalentes no lo hacen, y debido a que la formación de complejos ON no está ocurriendo a través de la hibridación de la base como se ha descrito anteriormente, la formación de complejos de quelato ON debe implicar alguna forma de "puente ión metálico" entre dos ON en lugares que comparten con facilidad un electrón capaz de rellenar un orbital de electrón vacío en el catión. Los lugares más susceptibles para este "intercambio de electrones" son los átomos sin puente de oxígeno (o azufre en el caso de reacción con fosforotio) en el enlace fosfodiéster (véase la Fig. 14B).

- Los ON bicatenarios, si se espera que el ADN o el ARN exhiban la misma formación de complejos de quelato y por lo tanto tener la misma propensión para quelar cationes metálicos de la solución.

- Estos puentes metálicos deben implicar interacciones intermoleculares ya que las interacciones intramoleculares no darían lugar a ningún aumento significativo de fluorescencia polarizada (véase las figs. 15 A-C y 16).

- Los complejos de quelatos ON solubles existen en cualquier concentración de ON y los cationes divalentes que no forman precipitados del complejo de quelato (véase la fig. 14D).

Los ON no pueden formar sales con cationes de metales divalentes y no se comportan como sales en solución acuosa. Esto está en contraste respecto a los cationes monovalentes (ejemplificados por el sodio en este ejemplo, aunque también es aplicable a otros cationes monovalentes tales como potasio, litio o amonio) que no forman sales con ON y se comportan como sales (electrolitos) en solución. Además, aunque todos los ON utilizados en este ejemplo eran sales de amonio, en solución acuosa, el ion amonio probablemente se disocia del ON (como sería de

esperar de una sal) y no proporciona inhibición para la formación de complejos de quelatos ON por cationes divalentes. Esto se ve reforzado por la observación de que no parece que la sal monovalente adicional (en este caso NaCl 80 mM) interfiera con la formación de complejos de quelatos ON con cationes divalentes.

5 - Que la formación de complejos de quelato ON se puede esperar que ocurra con cualquier metal, metal de transición, lantánido o elemento actínido con un estado de carga 2+ y también es probable que ocurra con iones metálicos que pueden existir en un estado 3+ o más alto de carga (por ejemplo, cromo).

10 - Que los ON mayores que 40 mer de longitud o que albergan otras modificaciones o tienen cualquier secuencia de nucleótidos definida particular también se puede esperar que formen complejos de quelatos ON con cationes metálicos divalentes, siempre que contengan enlaces que sean capaces de compartir electrones en la misma forma que átomos de oxígeno no de puentes (o azufre) en los enlaces fosfodiéster tradicionales.

15 - Las sales de ON (por ejemplo, las sales de sodio) pueden ser útiles para quelar metales divalentes dentro de un paciente no humano o humano tales como, pero no limitado a: el cadmio, el mercurio, el plomo. Además, la quelación de un catión metálico divalente cualquiera en particular (por ejemplo, hierro) por un oligonucleótido de sal de sodio se puede suprimir mediante la preparación de la sal de sodio de ON como un complejo de quelato de ON con otro catión metálico divalente (por ejemplo calcio).

20 - Las sales de metales distintas de las sales de cloruro también pueden permitir la formación de complejos de quelatos ON. Tomando a las sales de calcio como un ejemplo, otras sales de calcio compatibles con la formación de complejos de quelato ON pueden incluir, sin restricción, gluconato de calcio, citrato de calcio, lactato de calcio, malato de calcio, aspartato de calcio, fumarato de calcio, ascorbato de calcio, benzoato de calcio, eritorbato cálcico, y/o propionato de calcio.

Ejemplo III

Los ON forman complejos de quelatos con diferentes sales de calcio y magnesio

25 Con el fin de demostrar adicionalmente la naturaleza universal de la formación de complejos de quelato ON y para demostrar también la utilidad de diferentes sales de cationes metálicos divalentes en la formación de complejos de quelato ON, se usaron dos formas diferentes de sales de calcio y de magnesio para preparar diversos complejos de quelato ON con ON de diferentes secuencias específicas. Las sales usadas fueron cloruro de calcio, sulfato de calcio, cloruro de magnesio y sulfato de magnesio. Los ON utilizados se enumeran en la Tabla 2 a continuación. Las condiciones de reacción de FP eran idénticas a las del Ejemplo 1 excepto que se omitió el EDTA para demostrar la formación de complejos de quelato de ON en ausencia de cualquier efecto mediado por EDTA.

30

Tabla 2

ON utilizados en el Ejemplo III

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	SEQ. ID. NO	Modificaciones
REP 2055-FL	(AC) ₂₀	6	PS
REP 2056-FL	(TC) ₂₀	7	PS
REP 2033-FL	(TG) ₂₀	5	PS
REP 2029-FL	A ₄₀	2	PS
REP 2028-FL	G ₄₀	1	PS
REP 2057-FL	(AG) ₂₀	8	PS
REP 2120-FL	N ₄₀ (C = 5' metilcitidina)	NA	PS
REP 2030-FL	T ₄₀	3	PS
REP 2129-FL	C ₆₀	12	PS
REP 2126-FL	C ₂₀	9	PS
REP 2128-FL	C ₅₀	11	PS
REP 2127-FL	C ₃₀	10	PS
REP 2006-FL	N ₄₀	NA	PS

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	SEQ. ID. NO	Modificaciones
REP 2139-FL	(A5'MeC) ₂₀	13	PS + 2' O Me
REP 2045-FL	N ₆₀	NA	PS
REP 2007-FL	N ₈₀	NA	PS

N = secuencia degenerada (incorporación aleatoria de A, G, C o T)

PS = reacción con fosforotio en cada enlace

2' O Me = 2' O metilación en cada ribosa

NA = no aplicable (la secuencia es degenerada)

5 Los resultados de estos experimentos se ilustran en las figs. 17-24 y demuestran que todos los ON probados pueden formar complejos ON con diferentes sales de calcio y magnesio. Dos excepciones a esta observación general son REP 2028-FL (40 mer de poli G, SEQ ID NO: 1; las figuras 18A y 22A) y REP 2029-FL (40 mer de poli A, SEQ ID NO: 2; las figuras 17B y 21B). Ambos de estos ON son polipurinas y, especialmente en el caso de poli G, se sabe que forman interacciones intramoleculares termodinámicamente estables (denominadas "G-cuartetos" en el caso de extensiones de poli G) que dan lugar a estos ON que forman complejos intramoleculares fuertes, donde el esqueleto del fosfodiéster es probable que se pliegue parcialmente dentro de este complejo o ya no pueda participar en las interacciones de la solución (al igual que la formación de complejos quelato. REP 2029-FL (SEQ ID NO: 2) fue débilmente capaz de formar complejos de quelato, lo que es probablemente debido a las débiles interacciones "A-cuarteto" que se producen con este ON. Por lo tanto, no abarcados en el presente documento son los ON que sólo comprenden poli A y poli G y aptámeros que forman interacciones intramoleculares termodinámicamente estables. Los ON abarcados en este documento no son totalmente ON poli A o poli G y/o aptámeros.

Los resultados del Ejemplo III muestran que se pueden utilizar diferentes formas de sales de magnesio y calcio para preparar complejos de quelatos ON e ilustrar adicionalmente lo siguiente:

20 - Todos los ON en el Ejemplo II (excepto REP 2006-FL) contienen secuencias específicas que no contienen ninguna de las secuencias palindrómicas capaces de formar horquillas ni son ninguna de estas secuencias auto-complementarias. Por lo tanto, ninguna de las formaciones del complejo de quelato de ON observadas son atribuibles a sucesos de hibridación.

25 La pobre capacidad de REP 2028-FL (SEQ ID NO: 1) y REP 2029-FL (SEQ ID NO: 2) para formar complejos de quelatos ON sugiere que se requiere una cadena principal de fosfodiéster relajada para la formación del complejo de quelato ON apuntando de nuevo a la estructura del fosfodiéster como la característica química en los ON necesaria para la conexión de dos o más ON para formar complejos de quelato.

- Cualquier ON que contenga un esqueleto de fosfodiéster se espera que será capaz de formar complejos de quelato, independientemente de otras modificaciones existentes, tales como la reacción con fosforotio, la modificación de 2' ribosa o la modificación del ácido nucleico bloqueado.

30 - Los complejos de quelatos ON se pueden formar con ON tan grandes como 80 mer de longitud y ON mayores que 80 mer de longitud también presentan el mismo comportamiento en presencia de cationes metálicos divalentes.

Ejemplo IV

Formación de complejos de quelato ON con ON de doble cadena

35 Los oligonucleótidos de doble cadena se forman a partir de dos oligonucleótidos complementarios de cadena sencilla que en solución acuosa se hibridan entre sí a través de interacciones de Watson-Crick. Ya que los ON bicatenarios todavía tienen un esqueleto de fosfodiéster expuesto en el exterior de la hélice de ADN formada, deben ser capaces de formar complejos de quelato en presencia de cationes divalentes. Con el fin de probar esta hipótesis, dos oligonucleótidos de ADN de doble cadena diferentes se prepararon mediante la hibridación de REP 2055-FL (40 mer poli AC; SEQ ID NO: 6) con REP 2033-FL (40 mer poli TG; SEQ ID NO: 5) y REP 2057-FL (40 mer poli AG; SEQ ID NO: 8) con REP 2056-FL (40 mer poli TC; SEQ ID NO: 7). Dado que la hibridación de ON da como resultado un dúplex, el incremento resultante en la masa pueden ser detectado por un aumento en la polarización de fluorescencia con respecto a los únicos ON de cadena sencilla usados para preparar el complejo. Los ON monocatenarios (REP 2055-FL (SEQ ID NO: 6), Rep 2033-FL (SEQ ID NO: 5), Rep 2057-FL (SEQ ID NO: 8) y REP 2056-FL (SEQ ID NO: 7)) se diluyeron cada uno a 20 nM en tampón 1 x FP. La hibridación de los dos pares complementarios como se identifica anteriormente también se llevó a cabo en tampón 1 x FP (10 nM de cada ON) y la hibridación se confirmó por un aumento en la polarización de fluorescencia. Las construcciones de doble cadena fueron entonces expuestas a CaCl₂ 100 mM o MgCl₂ 100 mM. La formación de complejos de quelato se controló mediante un aumento adicional de la polarización de fluorescencia (véase la Fig. 25). Los resultados de este experimento confirman la hibridación con éxito de los dos pares complementarios de ON en ON bicatenarios como

se evidencia por el aumento en la polarización de fluorescencia. Por otra parte, la adición de tanto CaCl_2 como MgCl_2 a estos ON bicatenarios resultó en un incremento adicional en la polarización de fluorescencia, lo que indica que estos ON de doble cadena también pueden formar complejos de quelato en presencia de cationes metálicos divalentes. Estos resultados también sugieren fuertemente que los ON de doble cadena pueden formar complejos de quelatos ON con cualquier catión divalente y también se espera que tengan el efecto secuestrante de dichos cationes divalentes de la solución.

Ejemplo V

Diversos cationes monovalentes no forman complejos de quelato con los ON

Para demostrar más específicamente que la formación de complejos de quelato ON no puede ocurrir en presencia de cationes monovalentes y que requieren específicamente cationes divalentes para su formación, se observó la formación del complejo ON con muchos ON (véase el Ejemplo 2) en tampón FP que contenía sólo una fuente de cationes. Fue preparado tampón 1x FP que contenía sólo una de las siguientes sales: cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, cloruro de calcio o cloruro de magnesio, todas a la concentración 80 mM de manera que la concentración de cationes en el tampón de FP fuera equivalente. Los ON marcados con fluorescencia como se describe en el Ejemplo 2 se diluyeron a 10 nM en los diferentes tampones FP y la formación del complejo de quelato ON se controló por polarización de fluorescencia (véase la Fig. 26). En el caso de cada ON probado, la formación del complejo de quelato sólo se observó con los cationes Mg^{2+} y Ca^{2+} y no con ninguno de los cationes monovalentes probados (Na^+ , K^+ o NH_4^+). Como se observa en el Ejemplo III, REP 2029-FL (SEQ ID NO: 2) y REP 2028-FL (SEQ ID NO: 1) muestran sólo una formación moderada o ninguna formación de complejos, respectivamente, en presencia de calcio o magnesio. Esto confirma aún más que los ON sólo pueden formar complejos de quelatos con cationes divalentes mientras que los ON sólo pueden existir como sales con sales monovalentes.

Ejemplo VI

Evaluación del contenido metálico en complejos de quelatos ON preparados en WFI

Para demostrar la amplia aplicabilidad de la preparación del complejo de quelato ON en todos los ON, se prepararon varios complejos de quelatos ON diferentes usando los ON y sales de cloruro de metal²⁺ como se indica en la Tabla 3. Todos los ON utilizados en estas preparaciones eran sales de sodio que se había desaladas para eliminar el sodio derivado de NaCl y dejar sólo el sodio integral en la formación de la sal ON en el ON final liofilizado. Se prepararon complejos de quelatos ON en agua para inyección (WFI) disolviendo primero la cantidad prescrita de sal sódica de ON a 50 mg/ml de concentración y añadiendo la cantidad prescrita de sal de cloruro de metal divalente a la solución de ON. Las soluciones ON antes de la adición de cloruro de metal divalente/formación de quelatos ON se analizaron para el sodio y el metal relevante por espectroscopía de emisión de plasma-óptico acoplado inductivamente (ICP-OES). Después de la formación de complejos de quelato ON, las muestras se desalaron mediante ultrafiltración utilizando un filtro de celulosa 5000 MWCO regenerado. Este filtro ha sido previamente validado para permitir la penetración de sales libres pero no ON o cationes unidos a ON. La solución de retenido (que contiene complejos de quelatos ON) se analizó para el contenido de sodio y metal mediante ICP-OES y para el contenido de cloruro mediante cromatografía iónica para confirmar que los metales divalentes presentes son quelados en ON y no derivados de sales de metales divalentes presentes en la solución de retenido (Tabla 4).

Tabla 3

Preparación de diversos complejos de quelatos ON

ON	Secuencia/química	Quelato de metal preparado	Cloruro de metal añadido (mg/100 mg de ON)	Concentración de ON
REP 2004	N ₂₀ /PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2006	N ₄₀ /PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2006	N ₄₀ /PS	Ca	20	50 mg/ml
REP 2006	N ₄₀ /PS	Ca	30	25 mg/ml
REP 2006	N ₄₀ /PS	Mg	20	50 mg/ml
REP 2006	N ₄₀ /PS	Fe ²⁺	2	25 mg/ml
REP 2107	N ₄₀ /PS, 2'OMe	Ca	10	37,5 mg/ml
REP 2107	N ₄₀ /PS, 2'OMe	Mg	15	37,5 mg/ml

ES 2 598 556 T3

ON	Secuencia/química	Quelato de metal preparado	Cloruro de metal añadido (mg/100 mg de ON)	Concentración de ON
REP 2107	N ₄₀ /PS, 2'OMe	Fe ²⁺	2	37,5 mg/ml
REP 2138 (SEQ ID N°: 14)	C ₄₀ /2'OMe	Ca	10	50 mg/ml
REP 2126 (SEQ ID NO: 9)	C ₂₀ /PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2031 (SEQ ID NO: 4)	C ₄₀ /PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2129 (SEQ ID N°: 12)	C ₆₀ /PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2057 (SEQ ID NO: 8)	(AG) ₂₀ /PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2057 (SEQ ID NO: 8)	(AG) ₂₀ /PS	Mg	15	50 mg/ml
REP 2057 (SEQ ID NO: 8)	(AG) ₂₀ /PS	Fe ²⁺	2	50 mg/ml
REP 2055 (SEQ ID NO: 6)	(AC) ₂₀ /PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2139 (SEQ ID N°: 13)	(A, 5MeC) ₂₀ /PS, 2'OMe	Ca	10	50 mg/ml
REP 2139 (SEQ ID N°: 13)	(A, 5MeC) ₂₀ /PS, 2'OMe	Ca	30	25 mg/ml
REP 2139 (SEQ ID N°: 13)	(A, 5MeC) ₂₀ /PS, 2'OMe	Mg	15	50 mg/ml
REP 2139 (SEQ ID N°: 13)	(A, 5MeC) ₂₀ /PS, 2'OMe	Ca, Mg	5/7,5	50 mg/ml

N = base degenerada (siendo una distribución aleatoria de A, G, T o C)

PS = fosforotioato

2'OMe = 2' O ribosa metilada

5MeC = 5'metilcitidina

Tabla 4

Validación del contenido metálico en diversas soluciones de complejos de quelatos ON

ON	Quelato de metal (mg/100 mg ON)	Solución de pre-quelato ON		Post-desalación del complejo de quelato ON		
		sodio	metal	cloruro	sodio	metal
REP 2004	Ca (10)	0,276%	<2,0 ppm	<10 ppm	<0,03%	664 ppm
REP 2006	Ca (10)	0,381%	<11 ppm	<8 ppm	400 ppm	614 ppm
REP 2006	Ca (20)	0,443%	1,21 ppm	<8 ppm	141 ppm	0,11%
REP 2006	Ca (30)	0,399%	2.0 ppm	<8 ppm	<110 ppm	861 ppm
REP 2006	Mg (20)	0,390%	<5 ppm	<9 ppm	110 ppm	564 ppm
REP 2006	Fe ²⁺ (2)	0,394%	<5 ppm	<10 ppm	979 ppm	176 ppm
REP 2107	Ca (10)	0,232%	<6 ppm	<9 ppm	215 ppm	539 ppm
REP 2107	Mg (15)	0,237%	<0,9 ppm	<9 ppm	162 ppm	339 ppm
REP 2107	Fe ²⁺ (2)	0,219%	2,5 ppm	15 ppm	0,049%	141 ppm
REP 2138 (SEQ ID NO: 14)	Ca (10)	0,210%	<0,04%	<10 ppm	3,2 ppm	745 ppm
REP 2126 (SEQ ID NO: 9)	Ca (10)	0,266%	<2,3 ppm	<10 ppm	<0,04%	681 ppm
REP 2031 (SEQ ID NO: 4)	Ca (10)	0,222%	<2,4 ppm	<9 ppm	<0,03%	772 ppm
REP 2129 (SEQ ID NO: 12)	Ca (10)	0,236%	<2,4 ppm	<10 ppm	<0,03%	681 ppm
REP 2057 (SEQ ID NO: 8)	Ca (10)	0,257%	5.5 ppm	<10 ppm	398 ppm	743 ppm
REP 2057 (SEQ ID NO: 8)	Mg (15)	0,250%	<1 ppm	<9 ppm	177 ppm	531 ppm
REP 2057 (SEQ ID NO: 8)	Fe ²⁺ (2)	0,244%	0,7 ppm	<9 ppm	0,101%	195 ppm
REP 2055 (SEQ ID NO: 6)	Ca (10)	0,238%	<6 ppm	<9 ppm	351 ppm	639 ppm
REP 2139 (SEQ ID NO:	Ca (10)	0,244%	<6 ppm	<8 ppm	347 ppm	638 ppm

ON	Quelato de metal (mg/100 mg ON)	Solución de pre-quelato ON		Post-desalación del complejo de quelato ON		
		sodio	metal	cloruro	sodio	metal
13)						
REP 2139 (SEQ ID NO: 13)	Ca (30)	0,236%	<1,8 ppm	<8 ppm	91 ppm	937 ppm
REP 2139 (SEQ ID NO: 13)	Mg (15)	0,247%	<1 ppm	<9 ppm	248 ppm	472 ppm
REP 2139 (SEQ ID N°: 13)	Ca (5), Mg (7,5)	0,276%	<9 ppm (Ca) <5 ppm (Mg)	<10 ppm	0,022% 0,314% (Mg)	0,033% (Ca)

Estos resultados confirman el desplazamiento parcial de sodio por calcio, magnesio o hierro (2+) en los ON que varían en longitud desde 20 hasta 60 mer, que varían en la secuencia de los ON completamente degenerados respecto a las tres secuencias específicas (poli C, poli CA y AG poli) y en los ON con o sin modificaciones de fosforotioato, con o sin modificaciones de 2' ribosa y que contienen modificaciones de fosforotioato y 2' ribosa. Se espera que la capacidad de formular ON modificados con 2' O metil ribosa en forma de complejos de quelatos se extiendan también a ON que contienen cualquier otro modificación de 2' ribosa tales como, pero no limitado a 2' fluoro y 2' O metioxiethyl. Además, demuestran que el desplazamiento de sodio significativo se logra con un mínimo aumento en el contenido de metal divalente, consistente con las estructuras del complejo de quelato descritas en la fig. 15. Estos resultados también ilustran las diversas combinaciones de calcio, magnesio, hierro (2+) y soluciones de sales de calcio/magnesio mezclados que se pueden utilizar para preparar complejos de quelatos ON y muestran que cualquier solución de sal de metal divalente o mezcla de soluciones de sales de metales divalentes pueden ser del mismo modo utilizadas para preparar complejos de quelatos ON.

Por lo tanto, los complejos de quelatos ON pueden prepararse a partir de los ON que están totalmente fosforotioados o no, que contienen cualquier número de enlaces fosforotioados, que contienen al menos una modificación de 2' ribosa o 2' ribosa totalmente modificada o que contienen modificación de 2' ribosa. Los ON pueden ser ARN o ADN o un híbrido que contiene ARN y ADN. La sal de metal usada en la preparación de un complejo de quelato ON incluye sin restricción una sal de calcio, una sal de magnesio, una sal de hierro, cualquier otra sal de metal divalente.

20 Ejemplo VII

Preparación de complejos de quelato ON estables en solución salina normal

Habiendo demostrado la naturaleza ampliamente conservada de la formación de complejos de quelato ON y la preparación con diferentes metales divalentes en los Ejemplos II y III, la preparación de complejos de quelato de calcio ON estables y solubles se examinó en solución salina normal, un excipiente más adecuado para la administración del complejo de quelato ON a un sujeto. Para este experimento, se utilizó una solución de 200 mg/ml de la sal sódica de REP 2006 en solución salina normal como la fuente de ON. La fuente de calcio era una solución al 10% de CaCl₂ en WFI (100 mg/ml de CaCl₂). Se prepararon varios complejos de quelatos de calcio de REP 2006 utilizando diferentes concentraciones de calcio y REP 2006 en soluciones de 1 ml a la temperatura ambiente (véase la Tabla 5) de acuerdo con el siguiente protocolo: 1) poner REP 2006 en el vial, 2) añadir una solución salina normal y mezclar y 3) añadir CaCl₂ y mezclar. Se observaron que en estas soluciones de quelatos de calcio REP 2006 aparecía un precipitado a los 36 días (véase la Tabla 6).

Tabla 5

Condiciones para la preparación de diversos complejos de quelato de calcio de REP 2006.

[REP2006] (mg/ml)	CaCl ₂ (mg por 100 mg de REP 2006)					
	15	20	25	30	35	40
100	500 µl REP 2006 + 350 µl NS + 150 µl CaCl ₂	500 µl REP 2006 + 300 µl NS + 200 µl CaCl ₂	500 µl REP 2006 + 250 µl NS + 250 µl CaCl ₂	500 µl REP 2006 + 200 µl NS + 300 µl CaCl ₂	500 µl REP 2006 + 150 µl NS + 350 µl CaCl ₂	500 µl REP 2006 + 100 µl NS + 400 µl CaCl ₂
50	250 µl REP 2006 + 675 µl NS + 75 µl CaCl ₂	250 µl REP 2006 + 650 µl NS + 100 µl CaCl ₂	250 µl REP 2006 + 625 µl NS + 125 µl CaCl ₂	250 µl REP 2006 + 600 µl NS + 150 µl CaCl ₂	250 µl REP 2006 + 575 µl NS + 175 µl CaCl ₂	250 µl REP 2006 + 550 µl NS + 200 µl CaCl ₂
25	125 µl REP 2006 + 837,5 µl NS + 37,5 µl CaCl ₂	125 µl REP 2006 + 825 µl NS + 50 µl CaCl ₂	125 µl REP 2006 + 812,5 µl NS + 62,5 µl CaCl ₂	125 µl REP 2006 + 800 µl NS + 75 µl CaCl ₂	125 µl REP 2006 + 787,5 µl NS + 87,5 µl CaCl ₂	125 µl REP 2006 + 775 µl NS + 100 µl CaCl ₂

5 Tabla 6 Formación de precipitado en complejos de quelato de calcio de REP 2006 a varias concentraciones de calcio y ON

TIEMPO	[REP 2006] (mg/ml)	CaCl ₂ (mg por 100 mg de PNA)					
		15	20	25	30	35	40
1 h	100	-	+	++	+++	+++	++++
	50	-	-	-	-	-	+
	25	-	-	-	-	-	-
24 h	100	-	-/+	+++++	+++++	+++++	+++++
	50	-	-	-	-	+	+++++
	25	-	-	-	-	-	-
7 d	100	-	-/+	+++++	+++++	+++++	+++++
	50	-	-	-	-	+++++	+++++
	25	-	-	-	-	-	-
36 d	100	-/+	-/+	+++++	+++++	+++++	++ +++
	50	-/+	-/+	-/+	-/+	+++++	+++++
	25	-	-	-	-	-	-

- solución clara, transparente

+ muy pequeña cantidad de precipitado blanco en el fondo del vial

++ precipitado coloidal fino, traslúcido

+++ precipitado fino coloidal, opaco

5 +++++ precipitado sobre todo en la parte inferior del tubo, pero coloides residuales presentes

+++++ precipitado en el fondo del tubo, la solución que queda es clara y transparente

En todos los casos, las soluciones de quelatos de calcio REP 2006 mostraron un descenso de la tensión superficial y un aumento de la viscosidad en comparación con las soluciones de REP 2006 en ausencia de calcio (en todas las concentraciones ensayadas), como lo demuestra un menisco más pronunciados en el vial y en el comportamiento de la disolución viscosa cuando los viales se invirtieron suavemente. Este comportamiento de la solución es consistente con la formación de grandes complejos multiméricos solubles (complejos de quelatos) como se representa en las figuras 15 A-C. Incluso en aquellos viales donde se había formado precipitado, en la solución restante todavía aparece este característico aumento de la tensión superficial y la viscosidad. Es posible que los precipitados formados en estas soluciones hayan adoptado las estructuras de quelato ON saturadas (e insolubles) como se ilustra en la figura 15D formando el ON no precipitado residual y el calcio todavía quelatos solubles en la solución. Se espera que estos comportamientos sean generalmente representativos del comportamiento de cualquier complejo de quelato de ON, independientemente de la longitud ON, la química, la estructura (de cadena sencilla o de doble cadena) o del metal divalente presente. Además, estos experimentos también demuestran que mientras que las concentraciones más altas de ON y de calcio pueden inicialmente formar complejos completamente solubles, estos probablemente son dinámicamente inestables y sufren una transición lentamente de complejos de quelatos solubles (como en las Figs. 15 A-C) a complejos de quelatos insolubles (FIG. 15D). Por lo tanto, puede ser deseable preparar complejos de quelatos ON a concentraciones de ON y metal tales como las que se muestran en la Tabla 5 que tienen complejos de quelatos ON solubles que son estables en solución. Para diferentes combinaciones de ON y metal, las concentraciones de ON y metal óptimas resultantes en complejos de quelatos ON soluble que permanecen solubles en solución con el tiempo pueden variar de aquellas concentraciones que se muestran para REP 2006 y calcio en la Tabla 5.

Los Ejemplos VI y VII describen varias combinaciones de concentraciones de ON y sal de metal divalente en diferentes excipientes que pueden ser útiles en la preparación de complejos de quelatos de ON y describen combinaciones de ON y sales de metales divalentes, o mezclas de sales de metales divalentes que dan como resultado soluciones de complejo de quelato ON que en solución salina normal o bien precipitan rápidamente, precipitan lentamente o bien permanecen completamente solubles durante un período prolongado de tiempo. Puede ser ventajoso utilizar las soluciones de quelatos ON con cualquiera de estas características de estabilidad.

Por lo tanto, se pueden preparar complejos de quelatos ON usando cualquier sal ON que incluya, pero no se limite a, una sal de sodio o una sal de amonio o una sal de sodio/amonio de ON mixta. Idealmente, la sal ON se disuelve en un excipiente acuoso incluyendo, pero no limitado al agua para inyección o solución salina normal. La fuente de metal divalente que se utiliza para la formación del quelato ON puede ser una sal de cloruro, una sal de sulfato o cualquier otra sal farmacéuticamente aceptable incluyendo, pero no restringido a, una sal de gluconato, una sal de citrato, una sal de lactato, una sal de malato, un sal de aspartato, una sal de fumarato, una sal de ascorbato, una sal de benzoato, una sal de eritorbato, y/o una sal de propionato. La sal puede comprender cualquiera de los siguientes cationes metálicos divalentes: calcio, magnesio, hierro (2+), manganeso, cobre y/o zinc. Además, se puede usar una mezcla de más de una sal metálica. Dicha sal de metal se puede utilizar directamente en forma de polvo, pero se prepara preferiblemente como una solución acuosa en el mismo excipiente en el que se disuelve el ON. Las sales metálicas se pueden preparar a cualquier concentración hasta el límite de solubilidad para dicha sal de metal en dicho excipiente. Los complejos de quelatos ON se preparan preferiblemente por adición lenta de la solución de sal de metal a la solución ON con mezcla constante para evitar la acumulación de precipitados de quelatos ON durante la adición de la solución de sal. Dependiendo de la concentración de ON y de la sal de metal usado, las soluciones de quelatos ON pueden formar lentamente precipitados de quelatos ON en el tiempo o permanecer completamente solubles (véase el Ejemplo VII).

Ejemplo de referencia VIII

50 La quelación del calcio sérico por los ON causa anti-coagulación de la sangre

Los efectos anti-coagulación de ON específicos se han descrito anteriormente, pero para demostrar los efectos anti-coagulación de los complejos de quelato ON en la presente descripción, se prepararon ON no marcados con FITC como sales de sodio de alta pureza de modo que fueran biológicamente compatibles. Estos ON eran REP 2004, REP 2006, REP 2107 y REP 2031 (SEQ ID NO: 4), estos son las versiones sin marcar de esos ON descritos en el Ejemplo 1. Estos ON a diversas concentraciones (en 500 µl de solución salina normal) se añadieron a 5 ml de sangre humana fresca entera recogida en tubos con citrato. El tiempo de protrombina (una medida aceptada para el estado de coagulación de la sangre) en la presencia de estos ON se evaluó mediante metodologías de laboratorio

clínicas aceptadas y se comparó con el tiempo de protrombina en presencia de volúmenes iguales de solución salina normal. El efecto relativo sobre la coagulación se expresó como una relación ($PTT_{oligo}:PTT_{solución\ salina\ normal}$) y se expresó como la relación normalizada (NR). Una NR de 1 indica el estado de coagulación normal y una NR mayor que 1 indica que la sangre está anticoagulada. Los resultados de estos experimentos se ilustran en la figura 27. Para todos los ON evaluados, se produjo un aumento dependiente de la dosis en la anti-coagulación.

REP 2055 (SEQ ID NO: 6) es un ON de 40 mer fosforotioado con secuencia (AC)₂₀. El efecto de la adición de 2,5 mM de la sal sódica de REP 2055 en el estado de coagulación de la sangre se evaluó como se describió anteriormente. Para determinar si el efecto anti-coagulación era debido a la quelación del calcio de la sangre, fue observado el efecto de diversas cantidades de suplementos de calcio (en forma de cloruro de calcio) en el REP 2055 (SEQ ID NO: 6) inducido por la anti-coagulación. Los resultados de este experimento se ilustran en la figura 28. Como se esperaba de los resultados en la Fig. 27, REP 2055 (SEQ ID NO: 6) 2,5 mM indujo una pronunciada anti-coagulación de la sangre. Esta anti-coagulación fue suprimida eficazmente por la administración de suplementos de calcio y se pudo revertir completamente a concentraciones de cloruro de calcio superiores a 2,25 mM. Estos resultados sugieren fuertemente que el efecto anti-coagulación de oligonucleótidos está mediado por la formación de complejos de quelato de ON en la sangre después de la administración de ON, lo que resulta en la quelación del calcio como se describe en los ejemplos anteriores. Además, estos resultados identifican además un método para la prevención de la anti-coagulación de la sangre por los ON que es neutralizar el efecto quelante del ON que se administra mediante la preparación de ON como complejo de quelato de calcio. La neutralización de la quelación de calcio también se puede lograr con un complejo de quelato ON preparado usando sales de otro metal divalente incluyendo, pero no limitado a: magnesio, manganeso, hierro (2+), cobre, y/o zinc. Estos métodos de la supresión de la anti-coagulación mediada por oligonucleótidos se puede esperar que sean eficaces con los oligonucleótidos administrados a un sujeto humano o no humano por IV u otras vías de administración.

Los resultados de este experimento también ponen en duda la naturaleza de la interacción de los ON con proteínas de suero. Los supuestos anteriores de la naturaleza de la anticoagulación de ON fue que los ON interactuaban directamente con las proteínas de la cascada de la coagulación pero los investigadores percibimos que la mayoría de estas proteínas son proteínas de proteínas que se unen al calcio o que están implicadas en la cascada de coagulación dependiente de calcio (Sheerhan y Lan, 1998, Blood 92: 1617). El hecho de que la anti-coagulación de la sangre de los ON pueda ser neutralizada mediante la adición de calcio y el hecho de que los ON actúan como quelantes de calcio sugiere lo siguiente:

- La unión de la proteína ON implicada en la anticoagulación puede ser necesaria pero no suficiente para la anticoagulación -la eliminación de calcio de las proteínas dependientes de calcio a través de su quelación por los ON puede ser el mecanismo por el cual los ON ejercen su actividad anticoagulante.

- Las interacciones de las proteínas ON con los componentes de la cascada de la coagulación pueden ser ellas mismas dependientes de calcio.

La albúmina, una proteína principal de la sangre, también se une al calcio y es una parte del mecanismo de regulación del calcio en suero. La albúmina también se sabe que interactúa con los ON y que probablemente juega un papel importante en la semivida circulante de los ON en la sangre. A partir de los resultados del experimento de anticoagulación anterior, parece que la mayor parte de las interacciones de las proteínas en la sangre puede ser catalizada en gran parte por la funcionalidad quelante del calcio de los ON. Por lo tanto, con el fin de reducir la interacción de las proteínas en suero, lo que también es probable que tenga el efecto de reducir la semivida circulante de los ON y mejorar su tolerabilidad con la administración parenteral, los ON se pueden administrar a un sujeto en forma de complejos de quelato de ON. Estos complejos podrían prepararse a partir de sales de calcio, pero también pueden prepararse a partir de otras sales metálicas apropiadas con el fin de neutralizar la propensión de los ON de quelar el calcio cuando se administran. Dichos complejos ya tendrían su actividad quelación neutralizada y, por lo tanto, se puede esperar que tengan una interacción reducida de forma significativa con las proteínas del suero. Las ventajas de esta interacción de las proteínas de suero reducida serían la tolerabilidad mejorada del ON administrado (como un complejo de quelato) y una semivida más corta del ON libre en la sangre.

Ejemplo de referencia IX

Desarrollo y prevención de la hipocalcemia en sujetos humanos con tratamiento de ON crónico

Para examinar adicionalmente si la quelación de cationes metálicos divalentes por los ON descrita en los ejemplos anteriores tiene relevancia biológica en sujetos humanos, el efecto de la administración de ON crónica sobre el calcio sérico fue examinado en pacientes con enfermedad hepática crónica. Estos sujetos son particularmente adecuados para examinar el efecto biológico (si lo hay) de la quelación de ON, ya que se ha demostrado que sufren de deficiencia de vitamina D, lo que normalmente está acompañado por trastornos del metabolismo mineral y de una densidad mineral ósea baja (Arteh et al., 2010, Dig. Dis. Sci., 55: 2624-2628 y George et al, 2009 World J. Gastroenterol., 15: 3516 a 3522). Por lo tanto, si el efecto de quelación de los ON administrados crónicamente estaba alterando la homeostasis del metal divalente en sujetos humanos (tal como el calcio) el efecto de esta alteración se observaría más fácilmente en estos pacientes, ya que serían poco capaces de contrarrestar cualquier desequilibrio de metal suero si ocurriera. Los pacientes con infección por hepatitis B crónica (con enfermedad

hepática crónica diagnosticada) fueron tratados una vez por semana con el ON REP 2055 (SEQ ID NO: 6) (como una sal de sodio de calidad GMP) por infusión lenta IV en solución salina normal. Los niveles de calcio total en suero fueron controlados en sujetos mediante métodos de laboratorio clínicos aceptados. Los dos primeros sujetos que recibieron tratamiento ON desarrollaron una hipocalcemia significativa en las 12 semanas de tratamiento (Fig. 29A). Esta hipocalcemia variaba en su severidad, pero persistió durante las siguientes 13 semanas de tratamiento. Los sujetos consecuentes que recibieron el tratamiento de ON crónico con REP 2055 (SEQ ID NO: 6) recibieron suplementos minerales (que proporcionan calcio, magnesio y zinc) para contrarrestar los efectos de quelación del tratamiento con ON. Ninguno de los sujetos que recibieron suplementos minerales desarrolló hipocalcemia durante el tratamiento con ON (fig. 29B). Estos resultados demuestran que la actividad de quelación de los ON se produce realmente en sujetos humanos. Esto se observó directamente con el calcio en suero, pero también puede ocurrir con otros cationes metálicos divalentes biológicamente relevantes, tales como magnesio, zinc y cobre). Además, las deficiencias de metal causadas por los efectos de quelación de ON pueden ser corregidas por la suplementación mineral y también pueden reducirse mediante la administración de los ON como complejos de quelatos.

Como se ha demostrado que los ON quelan a cationes metálicos divalentes en sujetos humanos, la administración de un ON no quelado podría ser útil para la quelación de metales pesados perjudiciales en un sujeto, tales como el mercurio, el cadmio, el plomo o incluso cromo (6+). Tal método implicaría la administración de una sal ON farmacéuticamente aceptable en un excipiente apropiado, el ON diseñado para ser desprovisto de funcionalidad dependiente de la secuencia (tal como, pero no limitado a los ON de secuencia específicos descritos en el Ejemplo III), preferentemente por la administración IV pero también por otras vías parenterales. Se espera que los pacientes con la función hepática normal sean capaces de contrarrestar la quelación de calcio, lo que se produciría, sin embargo; la administración de suplementos de minerales podría proporcionarse (como en el Ejemplo IX) para asegurar que se prevenga el agotamiento de suero de cationes divalentes biológicamente importantes. Tales ON no quelados podrían secuestrar los metales pesados presentes en la sangre, reduciendo o eliminando de inmediato los efectos nocivos de estos metales y también, potencialmente, acelerando su eliminación de los sujetos en cuestión.

Puesto que ha sido también demostrado que los ON de doble cadena también pueden formar complejos de quelato ON (y, por lo tanto, también secuestrar metales divalentes), se espera que la administración de cualquier ácido nucleico de doble cadena (por ejemplo, un siRNA) también tendría por lo menos algunos de los efectos de quelación descritos para ON monocatenarios en el ejemplo anterior. Por lo tanto, puede ser ventajoso preparar ON bicatenarios como complejos de quelato antes de la administración.

Ejemplo X

Los complejos de quelatos ON puede suprimir las reacciones del sitio de inyección de oligonucleótidos administrados por vía subcutánea

Las reacciones en el lugar de inyección (ISR) con oligonucleótidos administrados por vía subcutánea en pacientes humanos son comunes, incluso con oligonucleótidos muy modificados para reducir al mínimo sus propiedades inmunoestimulantes. Ya que la administración subcutánea consiste en la inyección de oligonucleótidos altamente concentrados (normalmente > 100 mg/ml), el efecto de quelación (más probable de calcio, pero tal vez también otros metales divalentes tales como magnesio) localizado alrededor del lugar de la inyección debe ser sustancial y podría contribuir a las ISR observadas rutinariamente. Para probar esta hipótesis, REP 2055 (SEQ ID NO: 6) o REP 2139 (SEQ ID NO: 13, un análogo de REP 2055 que tiene todas las ribosas 2' O metiladas y todas las bases de citosina 5' metiladas) se administró por vía subcutánea a pacientes humanos. Ambas soluciones se prepararon asépticamente en solución salina normal, ya sea como una sal de sodio o como un complejo de quelato de calcio (véanse las Tablas 7 y 8 y de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo VIII). Para el control de la variación entre paciente y paciente, ambas formulaciones de cada ON se evaluaron para determinar la reactividad de la inyección en el mismo sujeto humano. Los sujetos fueron monitorizados para ISR en cada sitio de inyección durante las 12 horas siguientes a la administración de REP 2055 (SEQ ID NO: 6) y durante las 72 horas siguientes a la administración de REP 2139 (SEQ ID NO: 13). Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 7 y 8.

Tabla 7. Supresión de la reactividad del sitio de la inyección de REP 2055 (SEQ ID NO: 6) por su preparación como un complejo de quelato de calcio (inyección de bolo de 1 cc, 20 mg CaCl₂/100 mg ON)

Sujeto humano	Reacción del sitio de inyección de 25 mg REP 2055 (SEQ ID NO: 6); 12 horas después de la inyección		
	25 mg REP 2055 (sal de sodio)	25 mg REP 2055 (quelato de Ca)	100 mg REP 2055 (quelato de Ca)
1	Induración: +++ inflamación: +++, sensibilidad: ++, dolor: ++	Induración: ninguno inflamación: ninguno sensibilidad: ninguno dolor: ninguno	Induración: + inflamación: ninguno sensibilidad: ninguno dolor: ninguno
2	Induración: +++ inflamación: +++, sensibilidad: +++, dolor: +++	No evaluado	Induración: + inflamación: ++ sensibilidad: ninguno dolor: ninguno

5 Tabla 8. Supresión de la reactividad del sitio de inyección de REP 2139 (SEQ ID NO: 13) por su preparación como un complejo de quelato de calcio (inyección en bolo de 2 cc, 30 mg CaCl₂/100 mg ON)

Sujeto humano	Reacción del sitio de inyección de 100 mg de REP 2139 (SEQ ID NO: 13)						
	Efecto secundario ISR	24 horas		48 horas		72 horas	
		Sal de sodio	Quelato de calcio	Sal de sodio	Quelato de calcio	Sal de sodio	Quelato de calcio
1	Induración	++	-	++	-	+	-
	Inflamación	++	+	++	-	+	-
	Sensibilidad	+	-	+	-	-	-
	Dolor	+	-	-	-	-	-
2	Induración	++	+	++	+/-	+	-
	Inflamación	+++	+	++	+/-	+	-
	Sensibilidad	+	-	+/-	-	-	-
	Dolor	+	-	+/-	-	+/-	-

Estos resultados demuestran que la administración de los ON como complejos de quelato de calcio reduce sustancialmente o elimina las ISR con dos ON diferentes administrados de forma subcutánea. Estos resultados demuestran además que la quelación de calcio (y potencialmente otros metales divalentes) por los ON juega un papel en la manifestación de las ISR típicamente asociadas con la administración subcutánea de ON. Además, estos resultados identifican un método para la prevención de las ISR con cualquier ON administrado por vía subcutánea mediante la realización de la administración de dicho ON como complejo de quelato. En estos ejemplos, el calcio se utilizó como el vehículo para la formación de complejos de quelatos, pero también se espera que la mitigación de las ISR ocurra con complejos de quelato ON que se habían preparado con otro metal divalente adecuado que no era de calcio. Cualquier complejo quelato metálico ON se esperaría que tuviera su propensión para quelar el calcio neutralizado, que sería el mecanismo subyacente para la mejora de la tolerabilidad SC del ON cuando se administra como un complejo de quelato. Se espera que la capacidad de los complejos de quelato ON para suprimir las ISR inducidas por oligonucleótidos sea eficaz para cualquier ON de cualquier secuencia específica y/o modificación u ON de cadena simple o doble a la luz de la naturaleza ampliamente conservada de la formación de complejos de quelato ON descritos en los ejemplos en el presente documento. Usando calcio como el metal divalente ilustrativo en este

ejemplo, otras sales de calcio podrían ser utilizadas en la preparación de complejos de quelato de ON y se espera que proporcionen complejos de quelato ON que tengan los mismos efectos supresores sobre las ISR mediadas por oligonucleótidos con la administración subcutánea que incluye, pero sin restricción, gluconato de calcio, citrato de calcio, lactato de calcio, malato de calcio, aspartato de calcio, fumarato de calcio, ascorbato de calcio, benzoato de calcio, eritorbato cálcico, y/o propionato de calcio. Los complejos de quelatos ON podrían ser preparados con sales de otros cationes de metal divalente tales como, pero sin limitación: magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc.

En la preparación de los complejos de quelatos ON, puede ser deseable utilizar otros cationes que no sean átomos divalentes pero que puedan evitar de manera similar el efecto de quelación de los oligonucleótidos. Los complejos de quelatos ON preparados con estos cationes también podrían ser utilizados en formulaciones para suprimir la anti-coagulación por los ON o para suprimir reacciones en el sitio de inyección con ON, cuando se administran por vía subcutánea o para evitar el secuestro de metales divalentes biológicamente importantes después de la administración de los ON. Dichos iones conjugados pueden incluir, sin limitación: los átomos de un estado de carga 3+ o más o cationes orgánicos.

En la preparación de complejos de quelatos ON, puede ser preferible preparar quelatos ON utilizando una mezcla de cationes divalentes (es decir, con sales de calcio y magnesio). Dichos quelatos ON mixtos pueden ser más fáciles de fabricar y tienen una mayor solubilidad que los quelatos preparados con un único catión divalente y, por lo tanto, serían más adecuados para aplicaciones de alta concentración.

Teniendo en cuenta los ejemplos anteriores utilizando diversas secuencias ON, con diversas modificaciones y en estado monocatenario o bicatenario y usando diversos metales divalentes, la formación de complejos quelantes ON puede ser considerada como una característica universal de cualquiera y todas los ON que tienen una estructura de fosfodiéster (tanto fosforotioada como no), independientemente de otras modificaciones. Como tal, la formación de complejos de quelato ON en la sangre o en el espacio subcutáneo es una característica normal de cualquier administración de ON cuando los ON se administran en forma de sales (por lo general, sales de sodio), lo que resulta en el secuestro de cationes metálicos divalentes a pesar de que los efectos secundarios de esta quelación puedan ser asintomáticos en la población objeto específica que recibe los ON en cuestión. Es importante destacar que hay varios ejemplos de ON (PRO-051/GSK2402968-Goemans et al, 2011 New England J. Med, 364: 1513-1522 e ISIS 301012 (mipomersen) -Viser et al, 2010, Curr. Opin. Lipidol. 21: 319-323), que han mostrado claramente reacciones ISR con la administración subcutánea (como sales de sodio) que son similares a las observadas con ISR en el Ejemplo IX y son, por lo tanto, diagnósticas de la formación de complejos de quelato ON después de su administración.

A pesar de que ambos de estos ON tienen diferentes secuencias y diferentes modificaciones 2' ribosa, ambos tienen una cadena principal de fosfodiéster (en ambos casos fosforotioada) y así pueden formar complejos de quelatos ON y secuestrar metales divalentes del medio local (en este caso el espacio subcutáneo). Por otra parte, estos dos ON han demostrado ser capaces de ejercer sus efectos biológicos a pesar de que la quelación de ON deba estar ocurriendo, por consiguiente, los complejos de quelatos ON en los sistemas biológicos no interfieren con la actividad biológica de los ON.

Es ampliamente aceptado y bien demostrado en la técnica que todos los ON fosforotioados (independientemente de la secuencia de nucleótidos) típicamente consiguen las concentraciones más altas del fármaco en el riñón y en el hígado. Históricamente, la administración crónica de muchos diferentes ON fosforotioados se han asociado con una disfunción hepática o renal leve. Si bien la causa de estas disfunciones no ha sido claramente dilucidada, dados los efectos de quelación conservados de los ON en general, es probable que la quelación de metales divalentes en el hígado y el riñón sea significativa con la administración crónica de ON, debido a que la actividad de quelación puede ser más pronunciada en estos órganos, debido a las altas concentraciones de los ON presentes. La administración de los ON como complejos de quelatos no alterará la biodistribución en los órganos (o afectará a la bioactividad como se muestra arriba), pero puede servir para prevenir las deficiencias de metales en el hígado y en el riñón que están teniendo un impacto en la función normal de estos órganos.

Dado que los complejos de quelatos de ON dan como resultado la formación de complejos multímeros de ON en solución, estos complejos pueden tener una mucha mayor resistencia a la degradación de nucleasa y, potencialmente, a la hidrólisis y los ON de fosforotioato también pueden ser más resistentes a la oxidación. Por lo tanto, el almacenamiento de cualquier ON como un complejo de quelato puede aumentar enormemente su estabilidad en solución acuosa sin alterar significativamente su bioactividad cuando se administra a un sujeto.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> REPLICOR INC.
Andrew VAILLANT
Michel BAZINET

<120> COMPLEJOS DE QUELATOS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

10 <130> 05016051-32PCT

<150> US 61/375257
<151> 20-08-2010

15 <160> 14

<170> FastSEQ para windows versión 4.0

20 <210> 1
<211> 40
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> REP 2028, fosforotioato total

25 <400> 1
gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg 40

30 <210> 2
<211> 40
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> REP 2029, fosforotioato total

<400> 2
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 40

40 <210> 3
<211> 40
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> REP 2030, fosforotioato total

50 <400> 3
ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 40

<210> 4
<211> 40
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> REP 2031, fosforotioato total

60 <400> 4
ccccccccc ccccccccc ccccccccc ccccccccc 40

<210> 5
<211> 40
<212> DNA
65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> REP 2033, fosforotioato total

5 <400> 5
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 40

<210> 6
 <211> 40
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> REP 2055, fosforotioato total

15 <400> 6
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 40

<210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> REP 2056, fosforotioato total

25 <400> 7
 tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc 40

<210> 8
 <211> 40
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> REP 2057, fosforotioato total

35 <400> 8
 agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 40

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> REP 2126, fosforotioato total

45 <400> 9
 cccccccccc cccccccccc 20

50 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> REP 2127, fosforotioato total

60 <400> 10
 cccccccccc cccccccccc cccccccccc 30

<210> 11
 <211> 50
 <212> DNA
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 598 556 T3

<220>
<223> REP 2128, fosforotioato total

<400> 11
5 cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc 50

<210> 12
<211> 60
<212> DNA
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> REP 2129, fosforotioato total

<400> 12
15 cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc 60

<210> 13
<211> 40
20 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> REP 2139 fosforotioato total, 2' O metilribosa total, C = 5' metilcitolina

25 <400> 13
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 40

<210> 14
30 <211> 40
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> REP 2138; 2' O metilribosa total

<400> 14
ccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc 40

40

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en la supresión o reducción de las reacciones subcutáneas en el sitio de inyección en un sujeto de un oligonucleótido administrado subcutáneamente, comprendiendo dicha composición farmacéutica:
- 5 • un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende dos o más oligonucleótidos unidos a su estructura de fosfodiéster por un catión multivalente; y
- un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que al menos un oligonucleótido de dicho complejo tiene al menos un enlace fosforotioato y en el que dicho catión multivalente es un catión de metal divalente.
- 10 2. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho enlace entre dos o más oligonucleótidos ocurre en los átomos de oxígeno no enlazantes (o azufre en el caso de la fosforotioación) en el enlace fosfodiéster, y en el que dicho oligonucleótido se selecciona a partir de la siguiente Tabla:

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Modificaciones
REP 2032-FL	N ₆	PS
REP 2003-FL	N ₁₀	PS
REP 2004-FL	N ₂₀	PS
REP 2006-FL	N ₄₀	PS
REP 2107-FL	N ₄₀	PS + 2' O Me
REP 2086-FL	N ₄₀	2' O Me
REP 2031-FL	C ₄₀ (SEQ ID NO:4)	PS

N = secuencia degenerada (incorporación aleatoria de A, G, C o T);

PS = fosforotioación en cada enlace;

- 15 2' O Me = 2' O metilación en cada ribosa.

3. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicho catión de metal divalente es el calcio.
4. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicho catión de metal divalente es el magnesio.
- 20 5. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicho catión de metal divalente es cobalto, hierro (2+), manganeso, cobre o cinc.
6. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5, en donde dicho complejo de quelato comprende al menos un oligonucleótido bicatenario.
- 25 7. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho complejo de quelato comprende al menos un oligonucleótido completamente fosforotioado.
8. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho complejo de quelato comprende al menos un oligonucleótido con una ribosa 2' modificada.
- 30 9. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho complejo de quelato comprende un oligonucleótido seleccionado a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3 a 14.

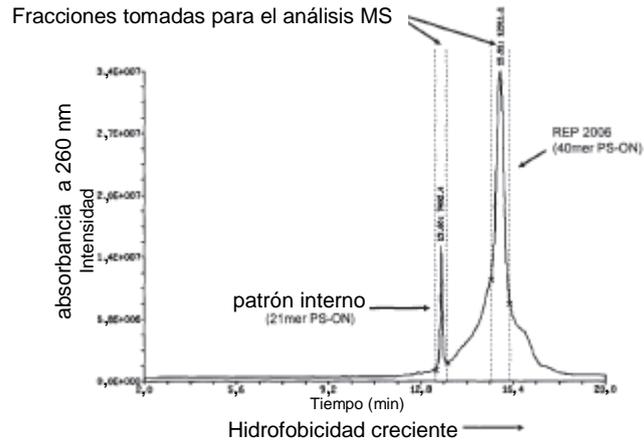


Fig. 1A

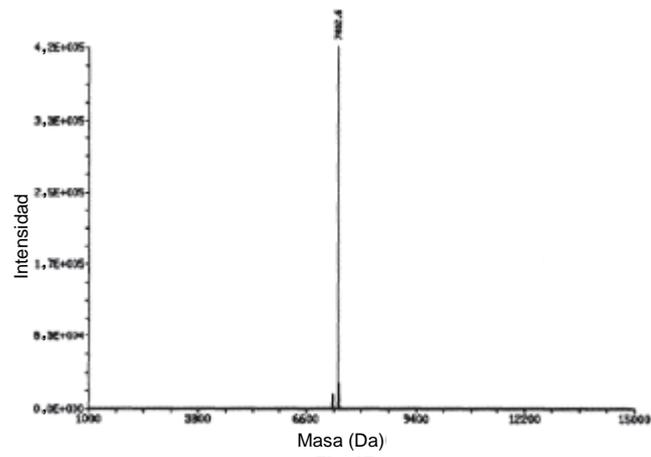


Fig. 1B

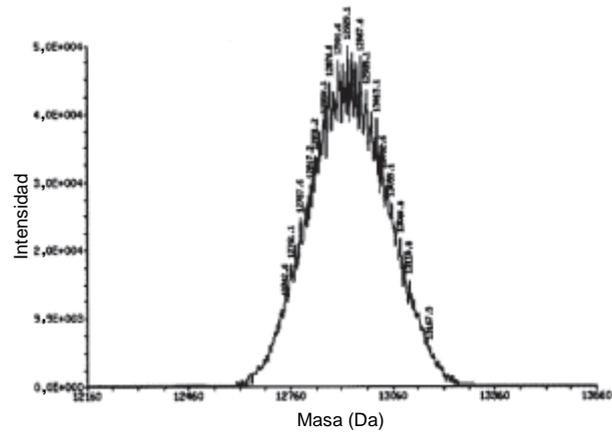


Fig. 1C

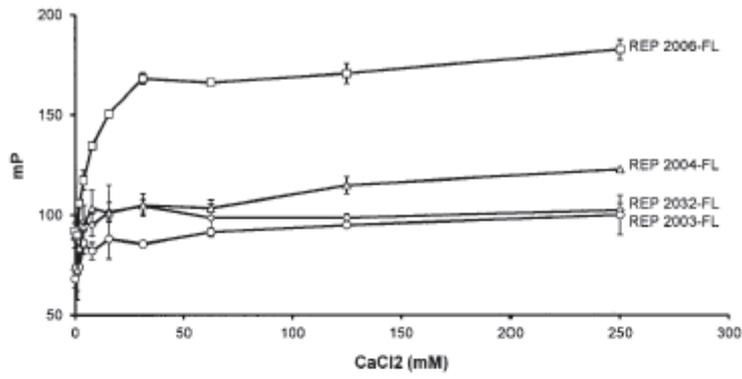


Fig. 2A

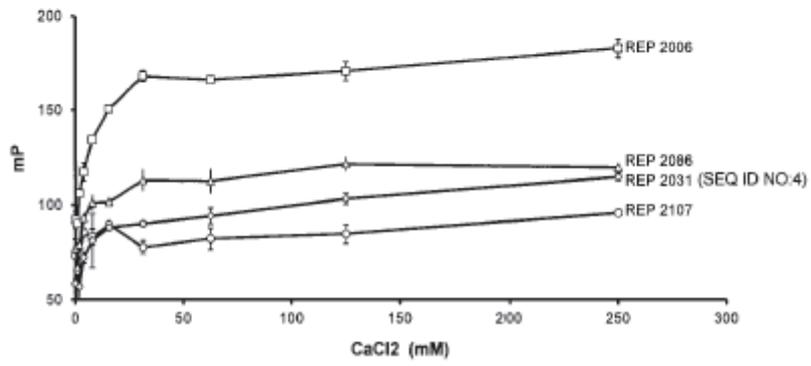


Fig. 2B

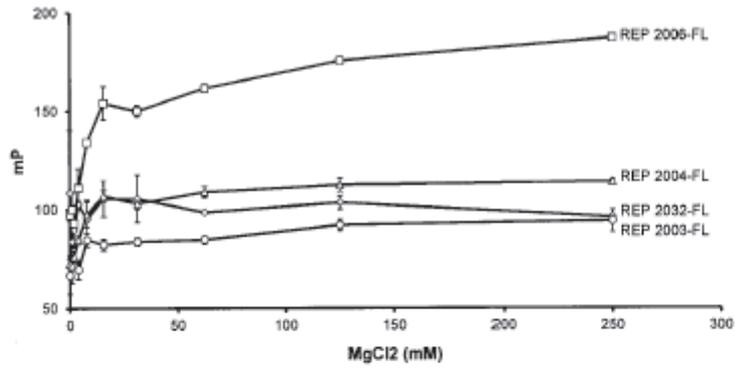


Fig. 3A

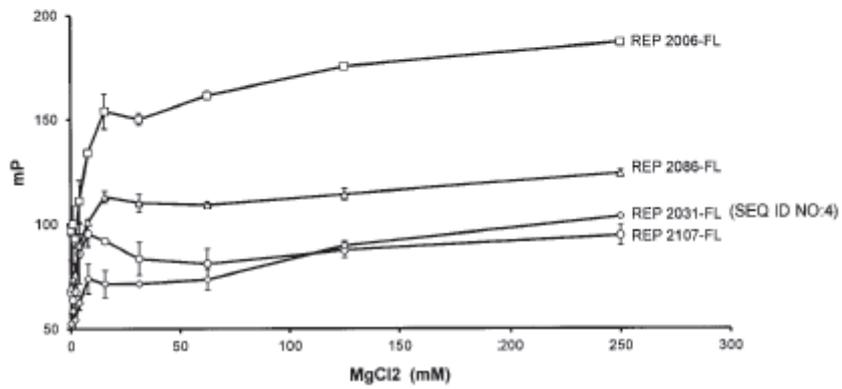


Fig. 3B

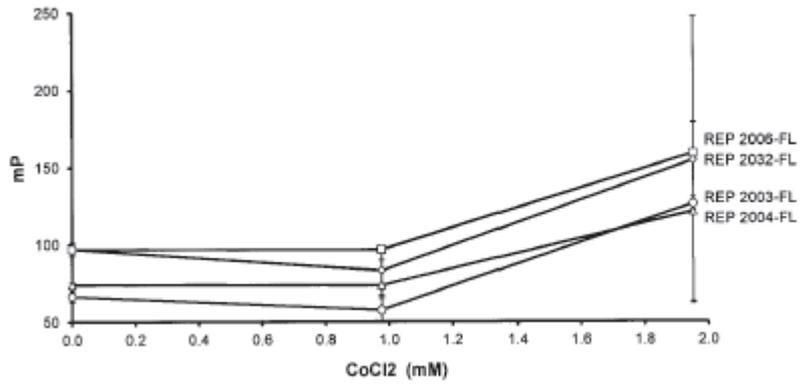


Fig. 4A

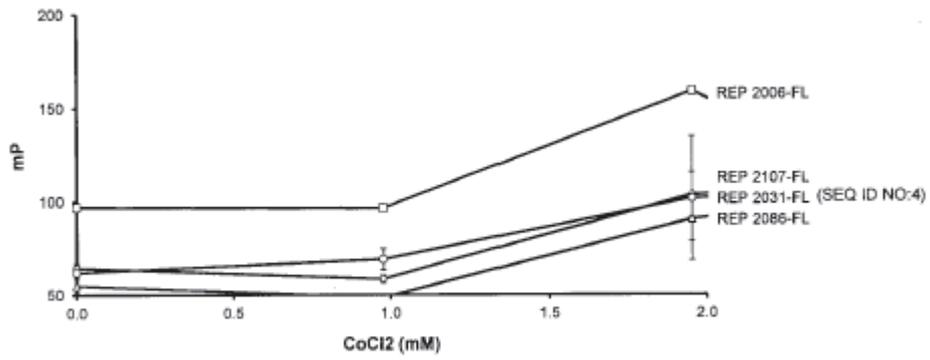


Fig. 4B

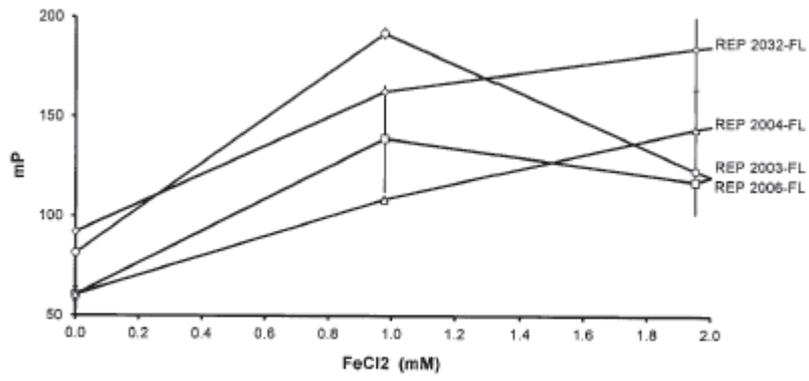


Fig. 5A

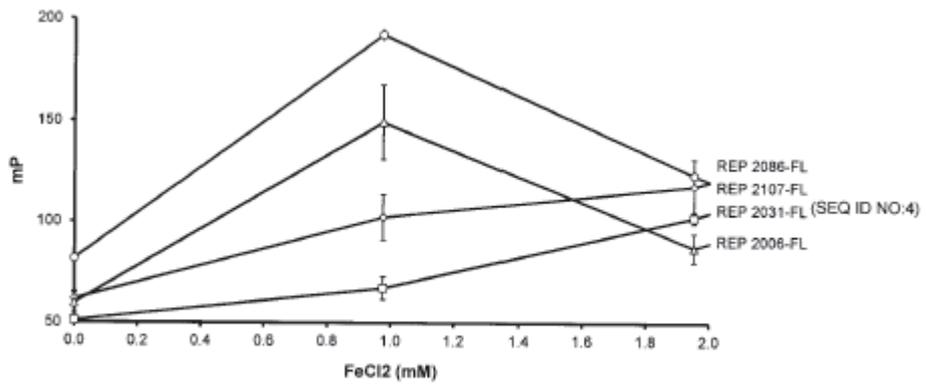


Fig. 5B

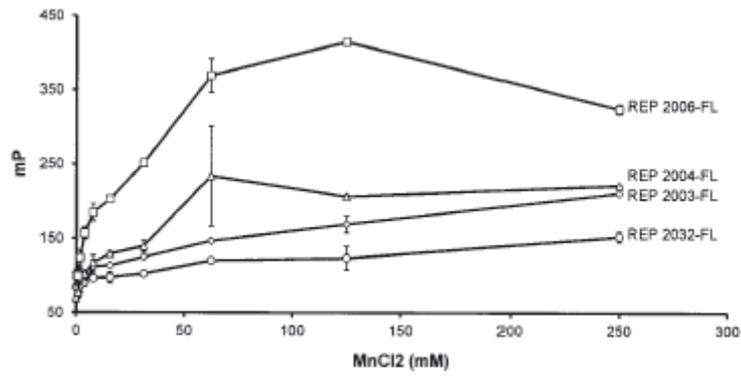


Fig. 6A

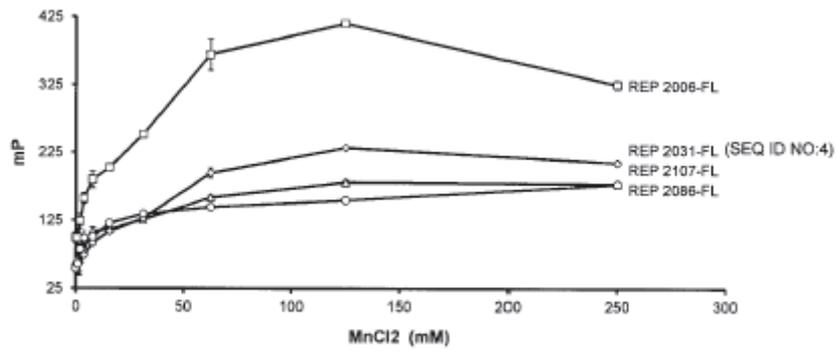


Fig. 6B

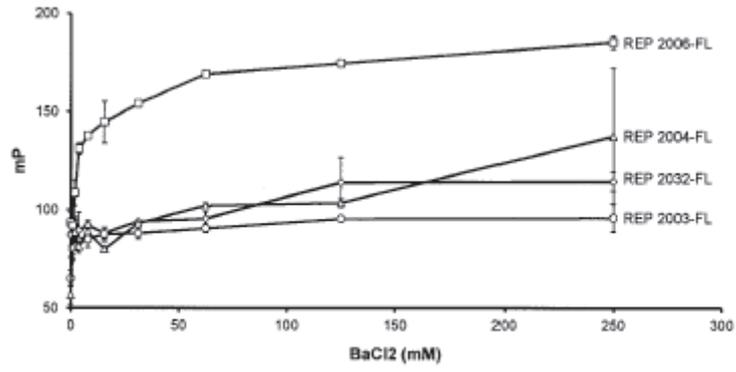


Fig. 7A

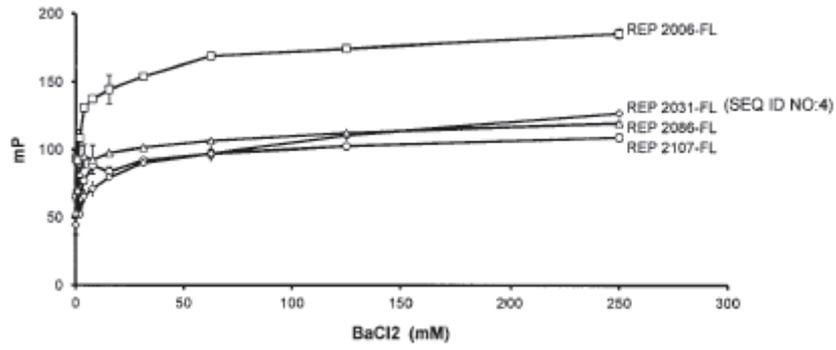


Fig. 7B

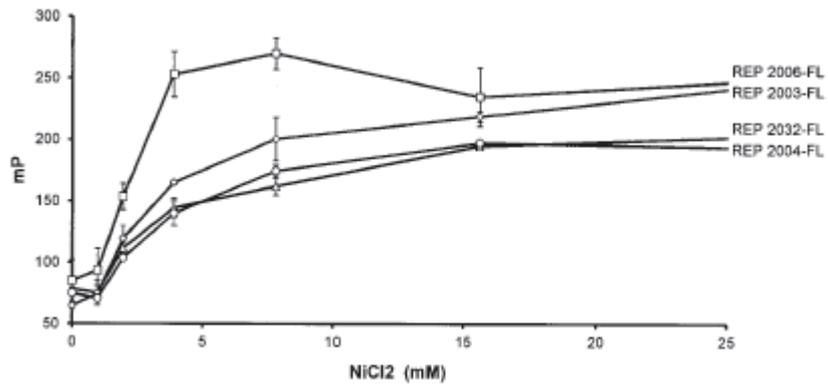


Fig. 8A

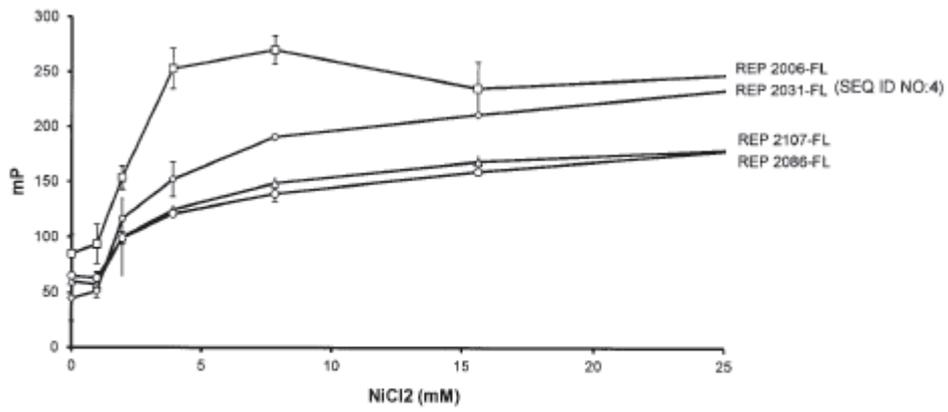


Fig. 8B

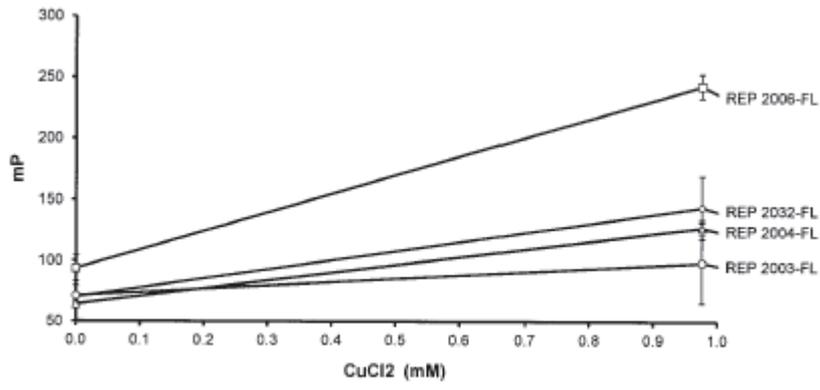


Fig. 9A

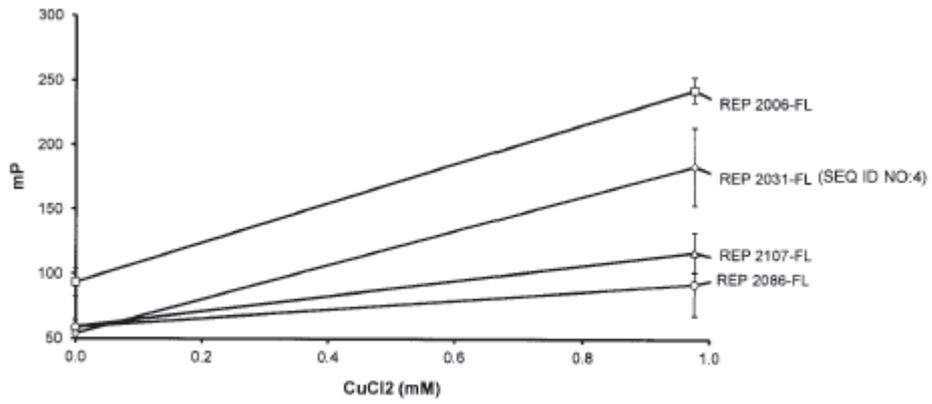


Fig. 9B

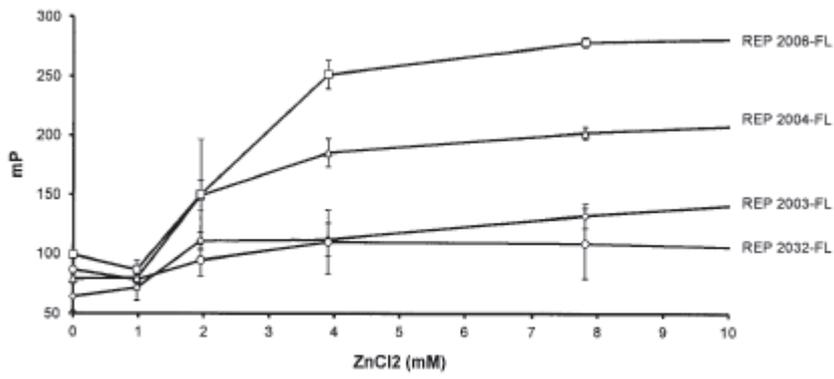


Fig. 10A

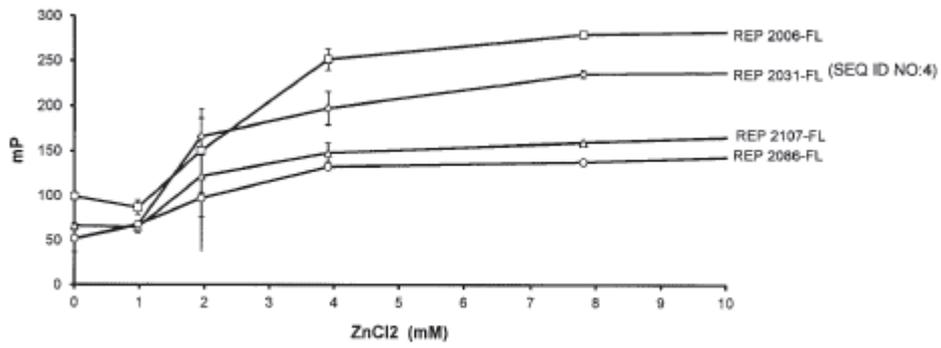


Fig. 10B

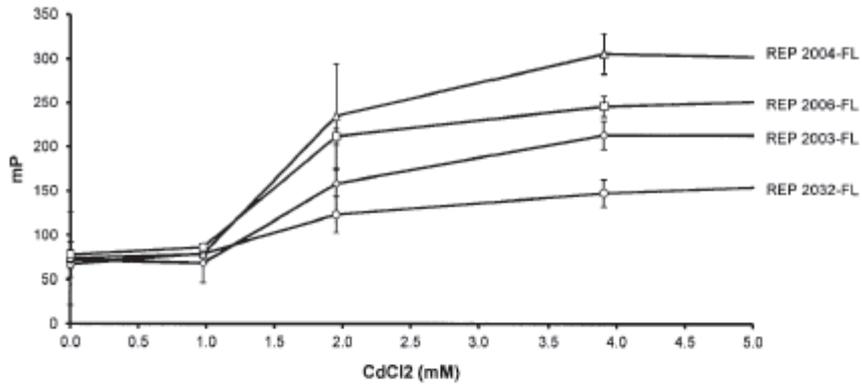


Fig. 11A

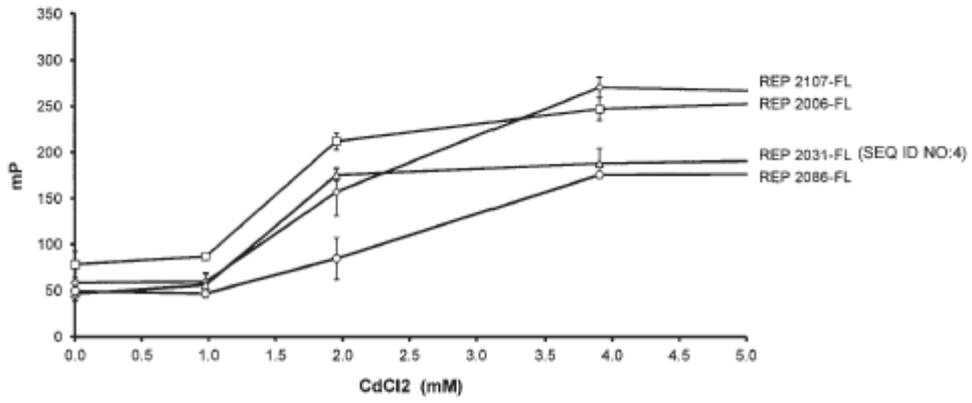


Fig. 11B

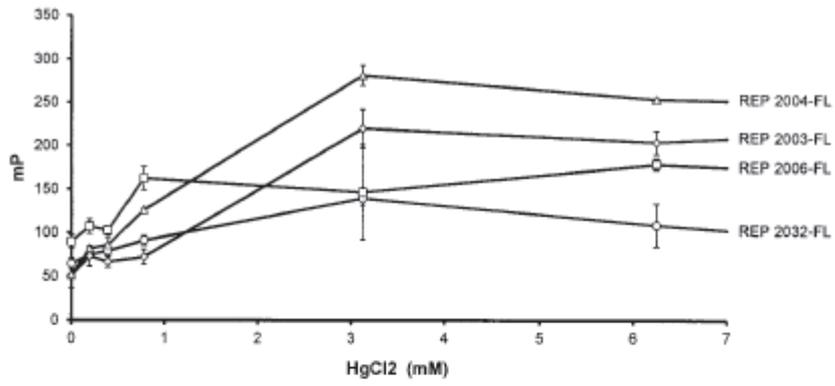


Fig. 12A

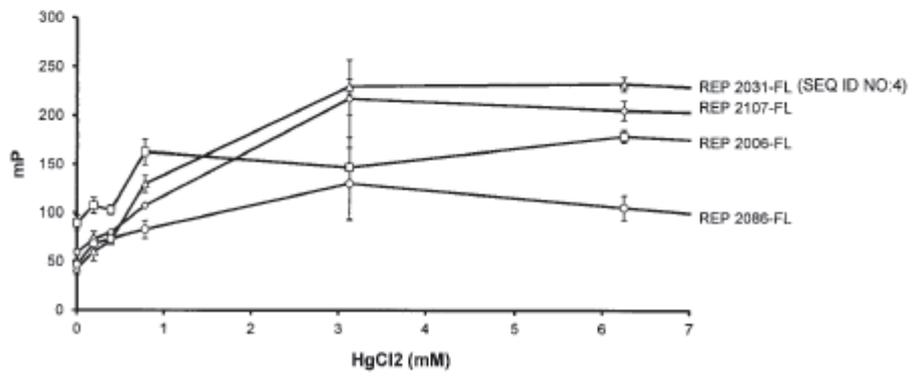


Fig. 12B

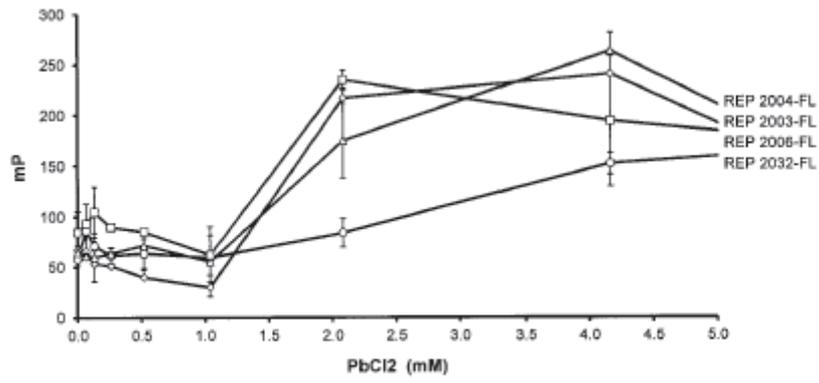


Fig. 13A

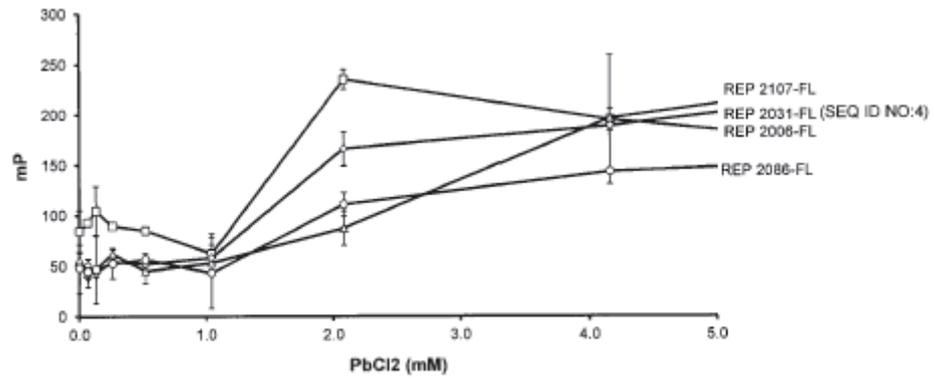


Fig. 13B

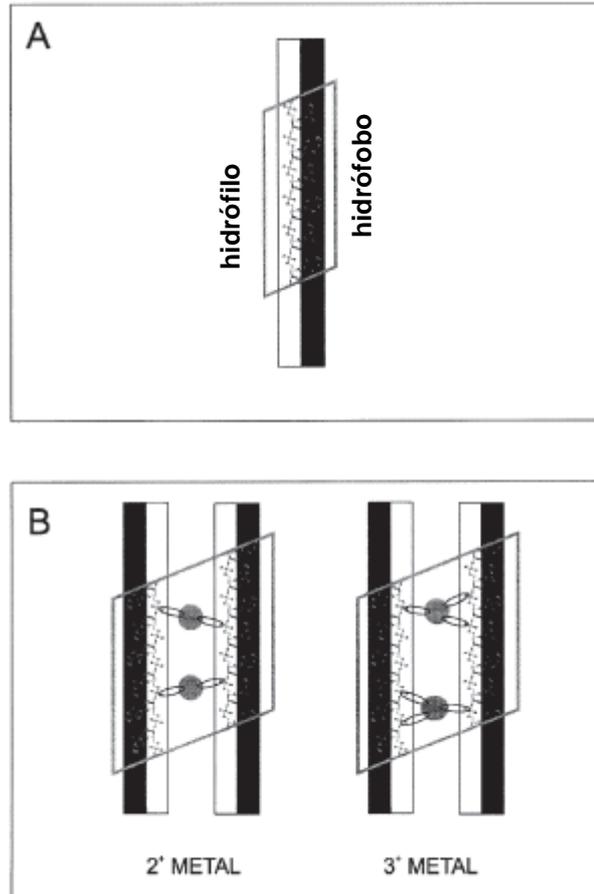


Fig. 14

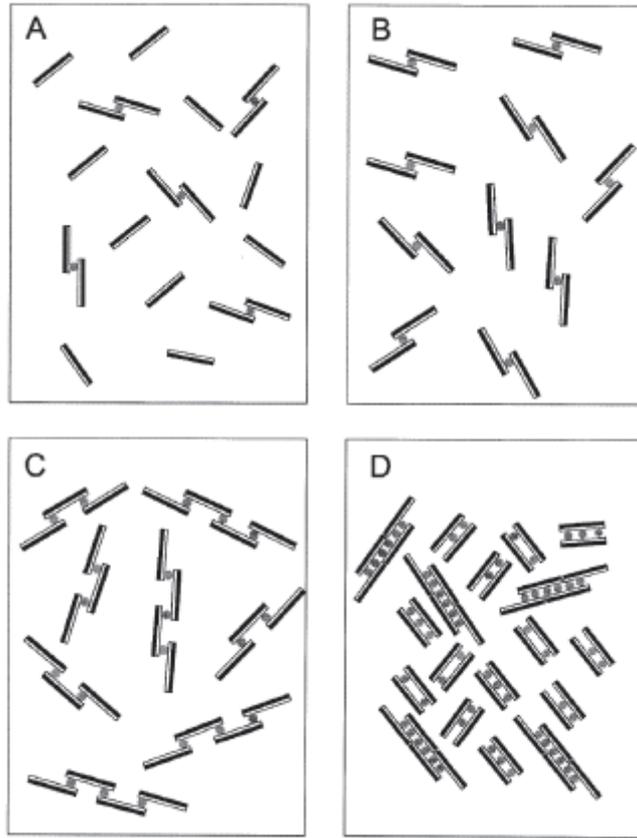


Fig. 15

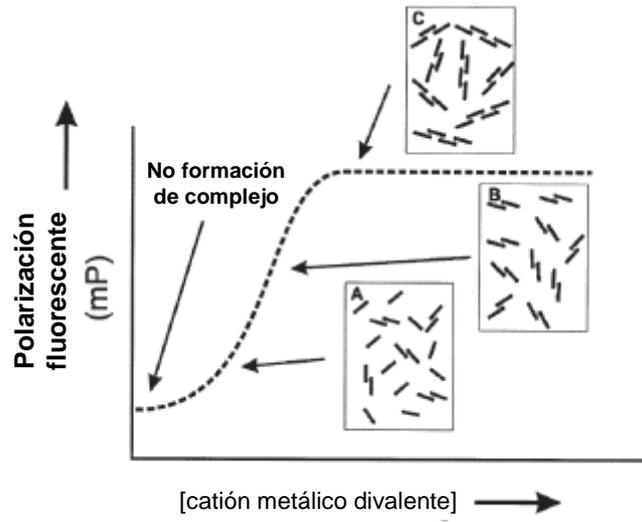


Fig. 16

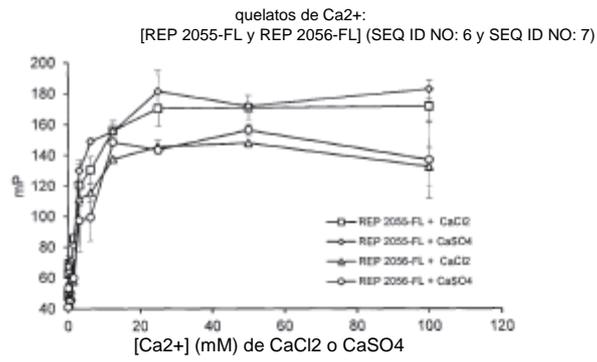


Fig. 17A

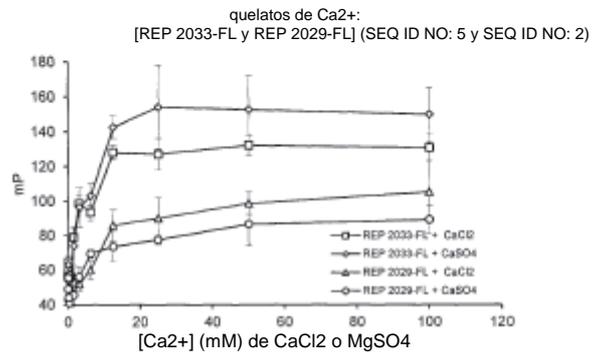


Fig. 17B

quelatos de Ca²⁺:
 [REP 2028-FL y REP 2057-FL] (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 8)

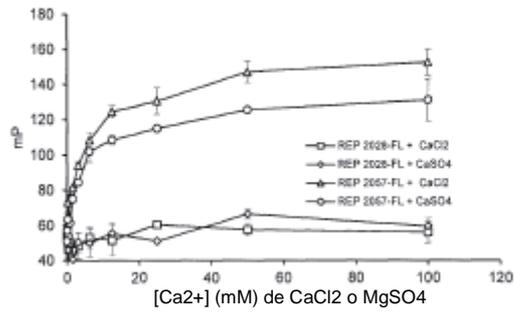


Fig. 18A

quelatos de Ca²⁺:
 [REP 2120-FL y REP 2030-FL] (SEQ ID NO: 3)

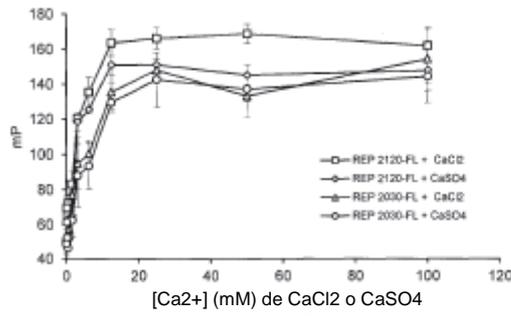


Fig. 18B

quelatos de Ca²⁺:
[REP 2129-FL y REP 2126-FL] (SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 9)

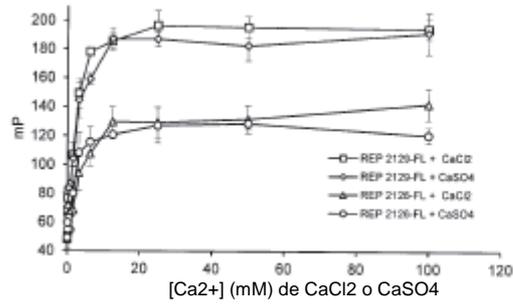


Fig. 19A

quelatos de Ca²⁺:
[REP 2128-FL y REP 2127-FL] (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 10)

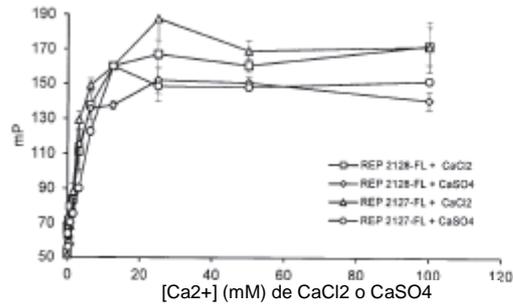


Fig. 19B

quelatos de Ca²⁺:
[REP 2139-FL y REP 2006-FL] (SEQ ID NO: 13)

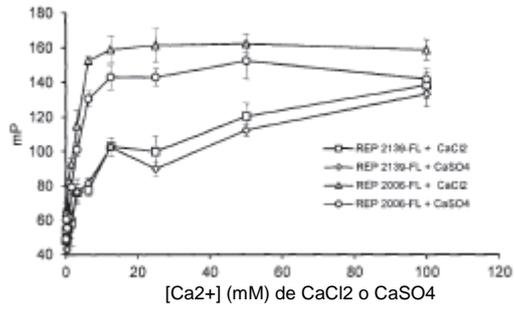


Fig. 20A

quelatos de Ca²⁺:
[REP 2045-FL y REP 2007-FL]

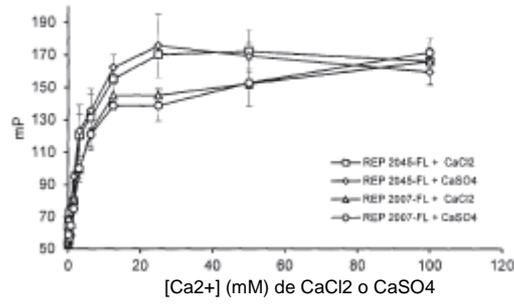


Fig. 20B

ES 2 598 556 T3

quelatos de Mg²⁺:
[REP 2055-FL y REP 2056-FL] (SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7)

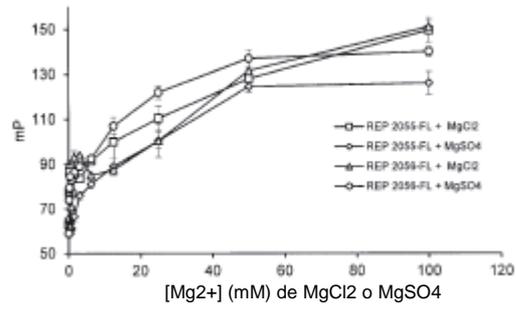


Fig. 21A

quelatos de Mg²⁺:
[REP 2033-FL y REP 2029-FL] (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 2)

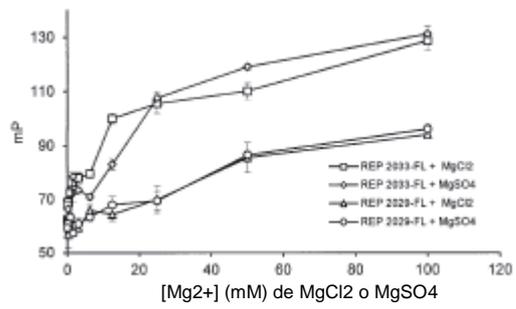


Fig. 21B

ES 2 598 556 T3

quelatos de Mg²⁺:
[REP 2028-FL y REP 2057-FL] (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 8)

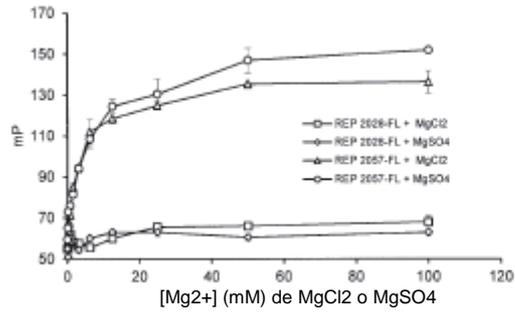


Fig. 22A

quelatos de Mg²⁺:
[REP 2120-FL y REP 2030-FL] (SEQ ID NO: 3)

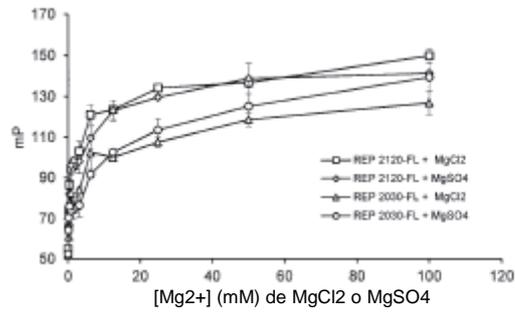


Fig. 22B

quelatos de Mg²⁺:
[REP 2129-FL y REP 2126-FL] (SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 9)

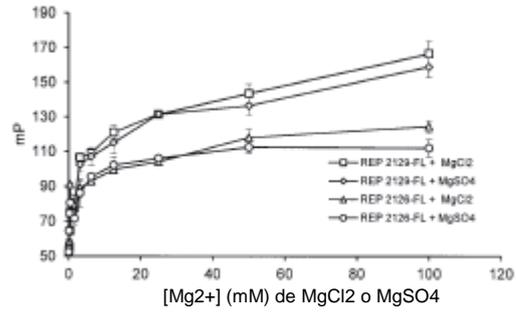


Fig. 23A

quelatos de Mg²⁺:
[REP 2128-FL y REP 2127-FL] (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO:10)

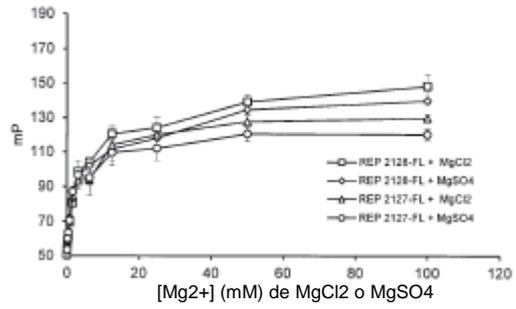


Fig. 23B

quelatos de Mg²⁺:
[REP 2139-FL y REP 2006-FL] (SEQ ID NO: 13)

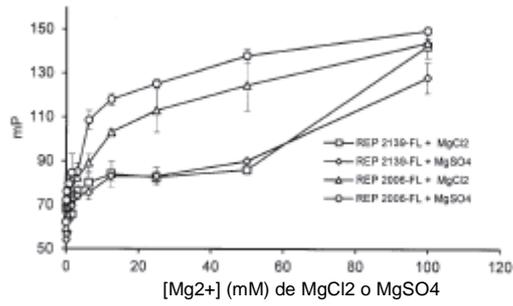


Fig. 24A

quelatos de Mg²⁺:
[REP 2045-FL y REP 2007-FL]

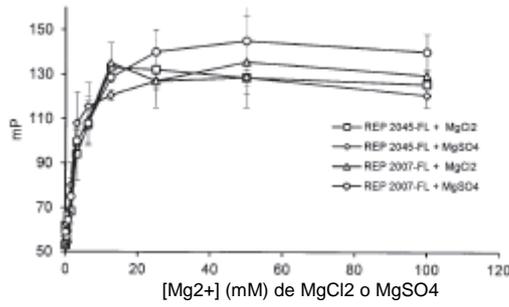


Fig. 24B

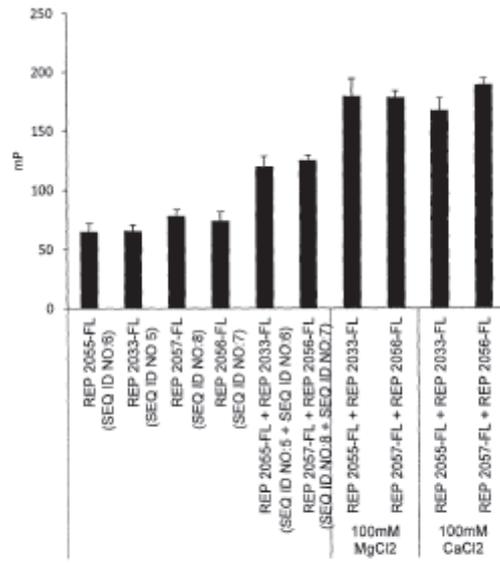


Fig. 25

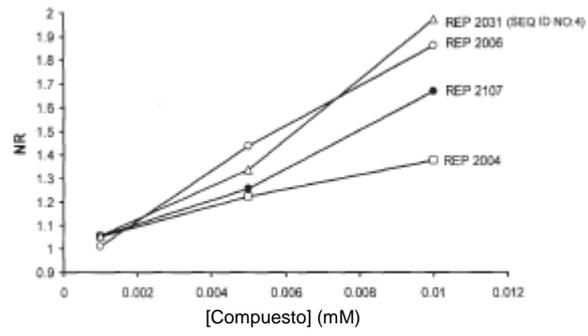


Fig. 27

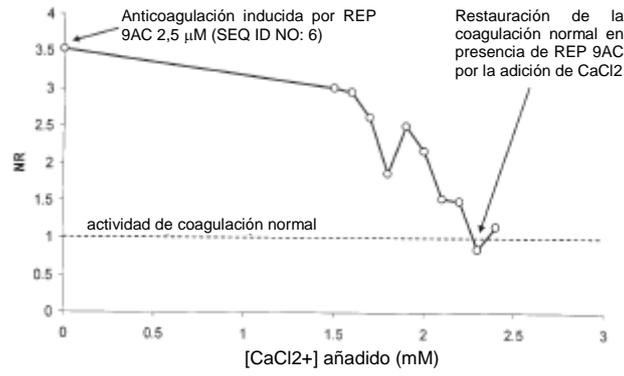


Fig. 28

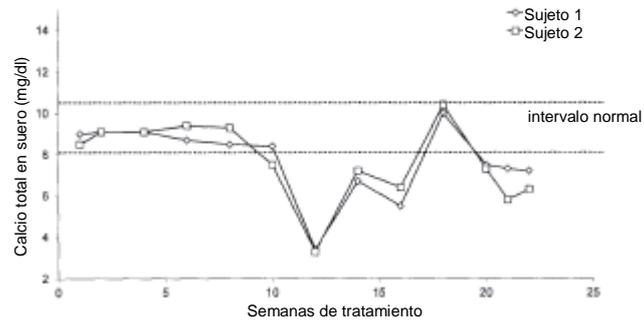


Fig. 29A

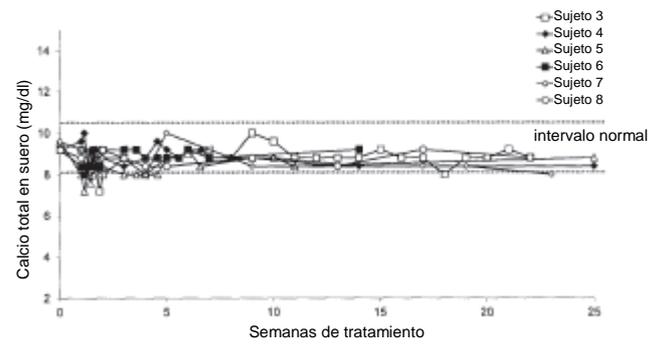


Fig. 29B