

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 589**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2010 PCT/US2010/045797**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11022427**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2010 E 10810508 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2467167**

54 Título: **Aptámeros frente al inhibidor de la vía del factor tisular y su uso como agentes terapéuticos frente a trastornos hemorrágicos**

30 Prioridad:

21.07.2010 US 366362 P

10.06.2010 US 353374 P

18.08.2009 US 234939 P

26.07.2010 US 367766 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2018

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)

Zählerweg 4

6300 Zug, CH y

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHAUB, ROBERT G.;

MCGINNESS, KATHLEEN;

NELSON, JENNIFER;

GENGA, RYAN;

WATERS, EMILY;

KURZ, JEFFREY C. y

DIENER, JOHN L.

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 655 589 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aptámeros frente al inhibidor de la vía del factor tisular y su uso como agentes terapéuticos frente a trastornos hemorrágicos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud de patente no provisional reivindica el beneficio de prioridad en virtud de 35 U.S.C. § 119(e) de las solicitudes de patente provisional estadounidense con números de serie 61/234.939, presentada el 18 de agosto de 2009; 61/353.374, presentada el 10 de junio de 2010; 61/366.362, presentada el 21 de julio de 2010; y 61/367.766, presentada el 26 de julio de 2010.

Campo de la invención

La invención se refiere en general al campo de los ácidos nucleicos y más particularmente a aptámeros que se unen al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), que son útiles como agentes terapéuticos en y agentes de diagnóstico de trastornos hemorrágicos y/u otras patologías, enfermedades o trastornos en los que se ha implicado TFPI. La invención se refiere además a materiales y métodos para la administración de aptámeros que se unen a TFPI.

Antecedentes de la invención

Aptámeros

Un aptámero es un ácido nucleico aislado o purificado que se une con alta especificidad o afinidad a una diana a través de interacciones distintas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Un aptámero tiene una estructura tridimensional que proporciona contactos químicos para unirse específicamente a una diana. A diferencia de la unión de ácidos nucleicos tradicional, la unión de aptámeros no depende de una secuencia de bases lineal conservada, sino más bien de una estructura secundaria o terciaria particular. Es decir, las secuencias de ácido nucleico de los aptámeros son secuencias no codificantes. Cualquier potencial codificante que pueda poseer un aptámero es completamente fortuito y en absoluto desempeña un papel en la unión de un aptámero a una diana. Un aptámero minimizado típico tiene un tamaño de 5-15 kDa (15-45 nucleótidos), se une a una diana con afinidad de nanomolar a sub-nanomolar, y diferencia entre dianas estrechamente relacionadas (por ejemplo, los aptámeros normalmente no se unirán a otras proteínas del mismo gen o familia funcional).

Se han generado aptámeros frente a muchas dianas, tales como moléculas pequeñas, hidratos de carbono, péptidos y proteínas, incluyendo factores de crecimiento, factores de transcripción, enzimas, inmunoglobulinas y receptores.

Los aptámeros son capaces de unirse específicamente a dianas seleccionadas y modular la actividad de la diana o interacciones de unión, por ejemplo, a través de la unión, los aptámeros pueden inhibir o estimular la capacidad para funcionar de la diana. La unión específica a una diana es una propiedad inherente de un aptámero. La actividad funcional, es decir, la inhibición o estimulación de la función de una diana, no lo es. Con frecuencia, un aptámero se une a una diana y tiene poco o ningún efecto sobre la función de la diana. En ocasiones, un aptámero se une a una diana y tiene un efecto inhibitorio o estimulador sobre la función de una diana.

Los aptámeros tienen varias características deseables para su uso como agentes terapéuticos y agentes de diagnóstico, incluyendo alta especificidad y afinidad, actividad biológica, baja inmunogenicidad, propiedades farmacocinéticas ajustables y estabilidad.

Trastornos hemorrágicos

La coagulación es la formación de un trombo hemostático de fibrina/celular estable que es suficiente para detener la hemorragia. El proceso de coagulación, que se ilustra en la figura 1, implica interacciones bioquímicas y celulares complejas que pueden dividirse en tres fases. La fase 1 es la formación del factor X activado o bien por la vía de contacto (intrínseca) o bien por la vía del factor tisular/VIIa (extrínseca). La fase 2 es la formación de trombina a partir de protrombina por el factor Xa. La fase 3 es la formación de fibrina a partir de fibrinógeno estabilizada por el factor XIIIa.

La hemofilia se define como un trastorno de coagulación congénito o adquirido que habitualmente, pero no siempre, implica una deficiencia cuantitativa y/o funcional de una sola proteína de coagulación. La deficiencia de los factores de coagulación VIII (hemofilia A) y IX (hemofilia B) son los dos trastornos hemorrágicos heredados más comunes. El número global total de pacientes con hemofilia A y B en todo el mundo es de aproximadamente 400.000; sin embargo, aproximadamente solo 1/4 (100.000) de estos individuos se tratan. La hemofilia A y B puede dividirse además con respecto al grado de deficiencia de factor. Hemofilia leve es con el 5-40 % de niveles normales de factor y representa aproximadamente el 25 % de la población hemofílica total. Hemofilia moderada es con el 1-5 % de niveles normales de factor y representa aproximadamente el 25 % de la población hemofílica total. Hemofilia grave es con <1 % de niveles normales de factor y representa aproximadamente el 50 % de la población hemofílica total y

son los principales usuarios de las terapias disponibles actualmente.

Desde el descubrimiento de la crioprecipitación por Pool (Pool *et al.*, "High-potency antihaemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate", *Nature*, vol. 203, pág. 312 (1964)), el tratamiento de estas deficiencias potencialmente mortales se ha centrado en el reemplazo de factor, con un esfuerzo continuo dirigido hacia la mejora en la calidad de los concentrados de factor VIII y IX. La mejora más significativa ha sido la disponibilidad de formas recombinantes de factores VIII y IX. Estas moléculas recombinantes altamente purificadas tienen un perfil de seguridad y eficacia que ha hecho de ellas la principal forma de factores de reemplazo usados para el tratamiento de la hemofilia. La mayoría de los pacientes con enfermedad leve y moderada se tratan "a demanda", que es cuando se produce la hemorragia. Aproximadamente el 50-60 % de los pacientes graves se tratan "a demanda", mientras que el resto de esta población usa terapia profiláctica, que implica administrar factor intravenoso 2-3 veces a la semana.

Desgraciadamente, los factores recombinantes todavía conservan algunas de las limitaciones de los concentrados y los factores derivados de plasma más altamente purificados. Estas limitaciones incluyen la semivida relativamente corta de las moléculas, que requieren la inyección frecuente para mantener una concentración en plasma eficaz; el alto coste; y el desarrollo de respuestas de anticuerpos, especialmente al factor VIII, en una subpoblación de pacientes denominada pacientes con inhibidor.

En la mayoría de los pacientes que desarrollan anticuerpos inhibidores, el anticuerpo solo es transitorio. En aquellos pacientes con una respuesta de anticuerpos sostenida (~15 %), algunos responden a protocolos de inducción de tolerancia complejos y caros. Aquellos que no responden a la inducción de tolerancia (~5-10 %) requieren el uso de productos distintos al factor VIII/factor IX para controlar la hemorragia. Los concentrados de complejo protrombínico (PCC), la actividad contrainhibidora del factor VIII (FEIBA) y el factor VIIa recombinante (NovoSeven[®], FVIIa) son tratamientos de contrainhibición de factor VIII/factor IX eficaces para pacientes con inhibidor.

El tratamiento con factor VIIa recombinante (FVIIar) es el más usado de estos contrainhibidores. El factor VIIa forma complejos con el factor tisular endógeno para activar la vía extrínseca. También puede activar directamente el factor X. La respuesta al tratamiento con FVIIar es variable. La respuesta variable, junto con el bajo perfil farmacocinético (PK) de FVIIar, puede requerir múltiples inyecciones para controlar la hemorragia y limita significativamente su utilidad para el tratamiento profiláctico.

Actualmente está en marcha un esfuerzo importante hacia el desarrollo de moléculas modificadas de factor VIII, IX y VIIa con potencia, estabilidad y semivida en circulación mejoradas. Debe observarse que, en todos los casos, los productos representan mejoras progresivas en cuanto a la estabilidad, la farmacocinética y/o la formulación de factores de reemplazo existentes.

La vía del factor tisular/VIIa (extrínseca) proporciona la formación rápida de bajos niveles de trombina que puede servir como la respuesta hemostática inicial para iniciar y acelerar la vía intrínseca dependiente del factor VIII, V y IX. El factor tisular, el factor VIIa y el factor Xa desempeñan un papel fundamental en esta vía y está estrechamente regulada por un inhibidor de proteinasa de tipo Kunitz asociado con células endoteliales, el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI).

El inhibidor de la vía del factor tisular es un inhibidor de serina proteasa de 40 kDa que se sintetiza en y se encuentra unido a superficies de células endoteliales ("TFPI de superficie"), en plasma a una concentración de 2-4 nM ("TFPI en plasma") y se almacena (200 pM/10⁸ plaquetas) y se libera de plaquetas activadas. Aproximadamente el 10 % de TFPI en plasma está sin asociar, mientras que el 90 % está asociado con partículas de LDL oxidadas y es inactivo. Hay dos formas principales de TFPI, TFPI α y TFPI β (figuras 2 y 3).

TFPI α contiene 3 dominios señuelo de Kunitz, K1, K2 y K3. K1 y K2 imitan a sustratos de proteasa e inhiben por la unión estrecha pero reversible a las proteasas diana. En el caso de TFPI α , K1 se une a e inhibe el factor tisular/VIIa, mientras que K2 se une a e inhibe el Factor Xa. El papel para K3 se desconoce en este momento, pero puede desempeñar un papel en la unión a la superficie celular y la potenciación de la inhibición del factor Xa mediante K2. TFPI α tiene un péptido de cola C-terminal básico que es la región de sitio de unión a membrana para la molécula. Se estima que el 80 % del TFPI de superficie es TFPI α . TFPI α se une principalmente a la superficie endotelial asociada con los proteoglicanos de membrana. Se ha demostrado que la heparina libera TFPI α de endotelio cultivado, venas aisladas y tras la inyección de heparina intravenosa (i.v.) (no fraccionada y LMWH). La naturaleza exacta del mecanismo de liberación no está clara (competencia o liberación inducida), pero los niveles de TFPI pueden aumentarse 3-8 veces tras la administración de heparina i.v. También puede encontrarse algo de TFPI α unido a fosfatidilinositol glicosilado (GPI) a través de un correceptor no identificado.

TFPI β es una versión sometida alternativamente a corte y empalme de TFPI que está modificada de manera postraducciona con un anclaje de fosfatidilinositol glicosilado (GPI). Se estima que representa aproximadamente el 20 % del TFPI de superficie en células endoteliales cultivadas. Aunque tiene actividad inhibidora *in vitro*, el papel funcional *in vivo* está menos claro.

TFPI de superficie puede desempeñar un papel más importante en la regulación de la coagulación basándose en su ubicación en el sitio de lesión vascular y formación de trombo. TFPI de superficie representa la mayor proporción de TFPI activo. Los datos de varios laboratorios sugieren que TFPI también puede tener efectos complementarios/sinérgicos a través de interacciones con antitrombina III (ATIII) y proteína C.

TFPI se une al factor VIIa y al factor Xa a través de sus dominios K1 y K2 y a proteoglicanos a través de sus dominios K3 y C-terminal. El hecho de que TFPI desempeñe un papel clave en la inhibición tanto del factor tisular/VIIa como de Xa sugiere que la inhibición de TFPI podría proporcionar un único tratamiento o un tratamiento adyuvante que se administra además de o combinado con factores purificados recombinantes. Un enfoque para promover un estado protrombótico podría ser a través de la vía extrínseca de coagulación mediada por la regulación por incremento del factor tisular. Se ha sugerido que la inhibición de TFPI podría mejorar la coagulación en el paciente con hemofilia.

Los estudios han demostrado que la deficiencia de TFPI en ratones puede aumentar la formación de trombos, y que los anticuerpos frente a TFPI mejoran los tiempos de hemorragia en ratones deficientes en factor VIII y acortan la coagulación en plasma de pacientes con hemofilia. En el conejo, se indujo hemofilia A transitoria tratando a los conejos con un anticuerpo frente al factor VIII. A esto le siguió tratamiento con o bien reemplazo de factor VIII o bien un anticuerpo específico frente a TFPI de conejo. El tratamiento con anticuerpo anti-TFPI produjo una reducción en la hemorragia y una corrección de la coagulación que fue similar a la observada con el reemplazo de factor VIII. Liu *et al.* (Liu *et al.*, "Improved coagulation in bleeding disorders by Non-Anticoagulant Sulfated Polysaccharides (NASP)", *Thromb. Haemost.*, vol. 95, págs. 68-76 (2006)) notificaron los efectos de un polisacárido no anticoagulante aislado de algas pardas que inhibe TFPI. Un documento posterior de Prasad *et al.* (Prasad *et al.*, "Efficacy and safety of a new-class of hemostatic drug candidate, AV513, in dogs with hemophilia A", *Blood*, vol. 111, págs. 672-679 (2008)) también evaluó este polisacárido en perros con hemofilia A. En ambos estudios, se encontró que la inhibición de TFPI tenía un efecto positivo en el restablecimiento de un perfil de coagulación normal y, en el modelo de perro, una mejora en el perfil hemostático, incluyendo un tromboelastograma (TEG) mejorado y una reducción en el tiempo de hemorragia de las uñas. Estos datos sugieren que la inhibición de TFPI podría proporcionar un enfoque para tratar la hemofilia.

El documento WO 2007/014749 se refiere a métodos para la identificación de compuestos que aumentan o disminuyen el efecto inhibitorio de TFPI sobre la actividad del factor tisular y/o el factor Xa y/o la formación de trombina y a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos identificables por tales métodos.

Waters *et al.*, *Blood*, 2009, vol. 114, n.º 22, 544, se refiere a un aptámero que se une a y que inhibe el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) como estrategia terapéutica novedosa para tratar pacientes con hemofilia A.

Por consiguiente, sería beneficioso identificar terapias novedosas para antagonizar con TFPI en el tratamiento de trastornos hemorrágicos, o que se usen conjuntamente con intervenciones médicas, o que se usen en combinación con otro fármaco u otra terapia para inducir un estado procoagulante. La presente invención proporciona materiales y métodos para satisfacer estas y otras necesidades.

Sumario de la invención

La invención proporciona aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se unen al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), denominados en el presente documento "aptámeros frente a TFPI". Los aptámeros frente a TFPI pueden usarse antes, durante y/o después de intervenciones médicas, con o sin otros agentes, con el fin de reducir las complicaciones o efectos secundarios de los mismos.

Los aptámeros frente a TFPI se unen a o interaccionan de otro modo con TFPI o una o más partes (o regiones) del mismo. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Preferiblemente, el TFPI es TFPI humano. Preferiblemente, los aptámeros frente a TFPI se unen a TFPI y requieren contactos de unión, al menos en parte, fuera de las regiones K1 y K2, tales como la región K3/C-terminal. Más preferiblemente, los aptámeros frente a TFPI se unen al menos en parte a una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) que se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175, aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270, aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195,

aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276. Preferiblemente, el aptámero frente a TFPI tiene una constante de disociación para TFPI de 100 nM o menos.

Los ejemplos de aptámeros frente a TFPI incluyen, pero no se limitan a, aptámeros que comprenden una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, que se denomina en el presente documento ARC26835; SEQ ID NO: 2, que se denomina en el presente documento ARC17480; SEQ ID NO: 3, que se denomina en el presente documento ARC19498; SEQ ID NO: 4, que se denomina en el presente documento ARC19499; SEQ ID NO: 5, que se denomina en el presente documento ARC19500; SEQ ID NO: 6, que se denomina en el presente documento ARC19501; SEQ ID NO: 7, que se denomina en el presente documento ARC31301; SEQ ID NO: 8, que se denomina en el presente documento ARC18546; SEQ ID NO: 9, que se denomina en el presente documento ARC19881; y SEQ ID NO: 10, que se denomina en el presente documento ARC19882.

Preferiblemente, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico: mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mAmU-mA-mU-mA (SEQ ID NO: 1) (ARC26835), en la que "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo (que también se conoce en la técnica como un nucleótido que contienen 2'-OMe, 2'-metoxi o 2'-OCH₃). En algunas realizaciones, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.

Más preferiblemente, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico: mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mAmU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 2) (ARC17480), en la que "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. En algunas realizaciones, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2.

Incluso más preferiblemente, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico: NH₂-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mGdC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 3) (ARC19498), en la que "NH₂" procede de una fosforamidita con ligador de 5'-hexilamina, "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. En algunas realizaciones, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3.

Lo más preferiblemente, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico: PEG40K-NH-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mGdC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 4) (ARC19499), en la que "NH" procede de una fosforamidita con ligador de 5'-hexilamina, "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido, "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo y "PEG" es un polietilenglicol. En algunas realizaciones, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el resto PEG40K de SEQ ID NO: 4 es un resto PEG ramificado que tiene un peso molecular total de 40 kDa. En otras realizaciones, el resto PEG40K de SEQ ID NO: 4 es un resto PEG lineal que tiene un peso molecular de 40 kDa. En realizaciones adicionales, el resto PEG40K de SEQ ID NO: 4 es un resto metoxipolietilenglicol (mPEG) que tiene un peso molecular de 40 kDa. Todavía en realizaciones adicionales, el resto PEG40K de SEQ ID NO: 4 es un resto mPEG ramificado que contiene dos restos mPEG20K, que tienen cada uno un peso molecular de 20 kDa, tal como se muestra en las figuras 6-9, donde "20KPEG" se refiere a un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa. En una realización preferida, el resto PEG40K de SEQ ID NO: 4 es el resto PEG40K ramificado mostrado en la figura 6, donde "20KPEG" se refiere a un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa, y se conecta al aptámero tal como se muestra en la figura 7. En una realización más preferida, el resto PEG40K se conecta al aptámero usando una fosforamidita con ligador de 5'-amina, tal como se muestra en la figura 8, donde "20KPEG" se refiere a un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa. En la realización más preferida, el resto PEG40K es un resto mPEG que tiene un peso molecular total de 40 kDa y se conecta al aptámero usando una fosforamidita con ligador de 5'-hexilamina, tal como se muestra en las figuras 9A y 9B.

Alternativamente, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico: NH₂-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mGmU-mA-mU-mA-mU-mA-NH₂ (SEQ ID NO: 5) (ARC19500), en la que "dN" es un desoxinucleótido, "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo y "NH₂" procede de una fosforamidita con ligador de hexilamina. En algunas realizaciones, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5.

Para el aptámero frente a TFPI del párrafo [0029] es preferible un aptámero o una sal del mismo que comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico: PEG20K-NH-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mUmA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-NH-PEG20K (SEQ ID NO: 6) (ARC19501), en la que “dN” es un desoxinucleótido, “mN” es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo, “NH” procede de una fosforamidita con ligador de hexilamina y “PEG” es un polietilenglicol. En algunas realizaciones, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, los restos PEG20K de SEQ ID NO: 6 son restos PEG ramificados. En otras realizaciones, los restos PEG20K de SEQ ID NO: 6 son restos PEG lineales. En realizaciones adicionales, los restos PEG20K de SEQ ID NO: 6 son restos metoxipolietilenglicol (mPEG) que tiene un peso molecular de 20 kDa. Todavía en realizaciones adicionales, los restos PEG20K de SEQ ID NO: 6 son restos mPEG ramificados que contienen dos restos mPEG10K que tienen cada uno un peso molecular de 10 kDa.

Alternativamente, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico: mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mUmA-mU-mA-mU-mA (SEQ ID NO: 7) (ARC31301), en la que “dN” es un desoxinucleótido y “mN” es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. En algunas realizaciones, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7.

Para el aptámero frente a TFPI del párrafo [0031] es preferible un aptámero o una sal del mismo que comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico: mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mUmG-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 8) (ARC18546), en la que “3T” es una desoxitimidina invertida, “dN” es un desoxinucleótido y “mN” es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. En algunas realizaciones, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8.

Para el aptámero frente a TFPI del párrafo [0031] es más preferible un aptámero o una sal del mismo que comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico: NH₂-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mUmG-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 9) (ARC19881), en la que “NH₂” procede de una fosforamidita con ligador de 5'-hexilamina, “3T” es una desoxitimidina invertida, “dN” es un desoxinucleótido y “mN” es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. En algunas realizaciones, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 9.

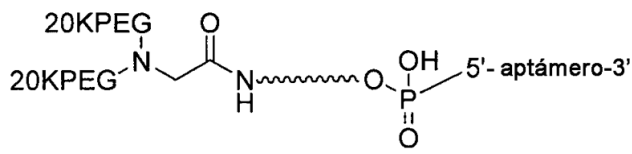
Para el aptámero frente a TFPI del párrafo [0031] es incluso más preferible un aptámero o una sal del mismo que comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico: PEG40K-NH-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 10) (ARC19882), en la que “NH” procede de una fosforamidita con ligador de 5'-hexilamina, “3T” es una desoxitimidina invertida, “dN” es un desoxinucleótido, “mN” es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo y “PEG” es un polietilenglicol. En algunas realizaciones, el aptámero frente a TFPI es un aptámero o una sal del mismo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, el resto PEG40K de SEQ ID NO: 10 es un resto PEG ramificado que tiene un peso molecular total de 40 kDa. En otras realizaciones, el resto PEG40K de SEQ ID NO: 10 es un resto PEG lineal que tiene un peso molecular de 40 kDa. En realizaciones adicionales, el resto PEG40K de SEQ ID NO: 10 es un resto metoxipolietilenglicol (mPEG) que tiene un peso molecular de 40 kDa. Todavía en realizaciones adicionales, el resto PEG40K de SEQ ID NO: 10 es un resto mPEG ramificado que contiene dos restos mPEG20K, que tienen cada uno un peso molecular de 20 kDa, tal como se muestra en las figuras 6-9, donde “20KPEG” se refiere a un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa. En una realización preferida, el resto PEG40K de SEQ ID NO: 10 es el resto PEG40K ramificado mostrado en la figura 6, donde “20KPEG” se refiere a un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa, y se conecta al aptámero tal como se muestra en la figura 7. En una realización más preferida, el resto PEG40K se conecta al aptámero usando una fosforamidita con ligador de 5'-amina, tal como se muestra en la figura 8, donde “20KPEG” se refiere a un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa. En la realización más preferida, el resto PEG40K es un resto mPEG que tiene un peso molecular total de 40 kDa y se conecta al aptámero usando una fosforamidita con ligador de 5'-hexilamina, tal como se muestra en las figuras 9A y 9B.

Preferiblemente, los aptámeros frente a TFPI se conectan a uno o más restos PEG, con o sin uno o más ligadores. Los restos PEG pueden ser cualquier tipo de resto PEG. Por ejemplo, el resto PEG puede ser lineal, ramificado, ramificado múltiple, en forma de estrella, en forma de peine o un dendrímero. Además, el resto PEG puede tener cualquier peso molecular. Preferiblemente, el resto PEG tiene un peso molecular que oscila entre 5-100 kDa de tamaño. Más preferiblemente, el resto PEG tiene un peso molecular que oscila entre 10-80 kDa de tamaño. Incluso más preferiblemente, el resto PEG tiene un peso molecular que oscila entre 20-60 kDa de tamaño. Aún incluso más preferiblemente, el resto PEG tiene un peso molecular que oscila entre 30-50 kDa de tamaño. Lo más preferiblemente, el resto PEG tiene un peso molecular de 40 kDa de tamaño, también denominado en el presente documento “40KPEG”. Pueden conectarse restos PEG iguales o diferentes a un aptámero frente a TFPI. Pueden usarse ligadores iguales o diferentes o no usarse ligadores para conectar restos PEG iguales o diferentes a un aptámero frente a TFPI.

Alternativamente, los aptámeros frente a TFPI pueden conectarse a una o más alternativas de PEG (en lugar de a uno o más restos PEG), con o sin uno o más ligadores. Los ejemplos de alternativas de PEG incluyen, pero no se limitan a, polioxazolina (POZ), poliPEG, hidroxietilalmidón (HES) y albúmina. La alternativa de PEG puede ser cualquier tipo de alternativa de PEG, pero debe funcionar igual que o similar al resto PEG, es decir, reducir la filtración renal y aumentar la semivida del aptámero frente a TFPI en la circulación. Pueden conectarse alternativas de PEG iguales o diferentes a un aptámero frente a TFPI. Pueden usarse ligadores iguales o diferentes o no usarse ligadores para conectar alternativas de PEG iguales o diferentes a un aptámero frente a TFPI. Alternativamente, puede conectarse una combinación de restos PEG y alternativas de PEG a un aptámero frente a TFPI, con o sin uno o más ligadores iguales o diferentes.

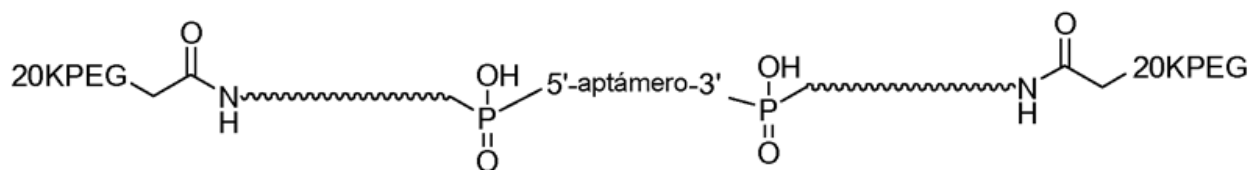
Preferiblemente, los aptámeros frente a TFPI se conectan a un resto PEG o una alternativa de PEG a través de uno o más ligadores. Sin embargo, los aptámeros frente a TFPI pueden conectarse a un resto PEG o alternativa de PEG directamente, sin el uso de un ligador. El ligador puede ser cualquier tipo de molécula. Los ejemplos de ligadores incluyen, pero no se limitan a, aminas, tioles y azidas. Los ligadores pueden incluir un grupo fosfato. Preferiblemente, el ligador procede de una fosforamidita con ligador de 5'-amina. En algunas realizaciones, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 2-18 grupos CH_2 consecutivos. En realizaciones más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 2-12 grupos CH_2 consecutivos. En realizaciones incluso más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 4-8 grupos CH_2 consecutivos. En las realizaciones más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 6 grupos CH_2 consecutivos, es decir, es una fosforamidita con ligador de 5'-hexilamina. Pueden usarse uno o más de los ligadores iguales o diferentes o no usarse ligadores para conectar uno o más de los restos PEG iguales o diferentes o una o más de las alternativas de PEG iguales o diferentes a un aptámero frente a TFPI.

En realizaciones preferidas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



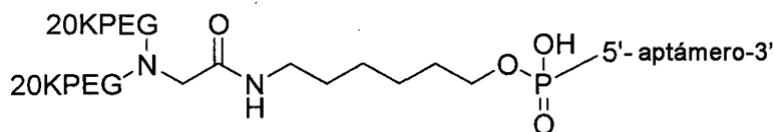
en la que $\text{HN} \sim \text{PO}_3\text{H}$ procede de una fosforamidita con ligador de 5'-amina, y el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. Preferiblemente, el aptámero se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 8. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En realizaciones preferidas alternativas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



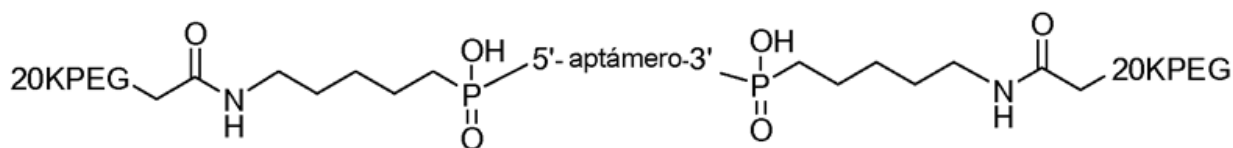
en la que $\text{HN} \sim \text{PO}_2\text{H}$ procede de una fosforamidita con ligador de 5'-amina, y el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. Preferiblemente, el aptámero se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En realizaciones más preferidas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



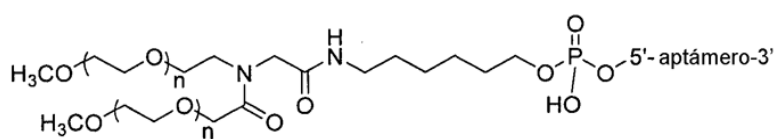
en la que el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. Preferiblemente, el aptámero se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 8. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En realizaciones más preferidas alternativas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



en la que el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. Preferiblemente, el aptámero se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa

En las realizaciones más preferidas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



en la que "n" es aproximadamente 454 unidades de óxido de etileno (PEG = 20 kDa), y el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. "n" es aproximadamente 454 unidades de óxido de etileno porque el número de n puede variar ligeramente para un PEG que tiene un peso molecular particular. Preferiblemente, "n" oscila entre 400-500 unidades de óxido de etileno. Más preferiblemente, "n" oscila entre 425-475 unidades de óxido de etileno. Incluso más preferiblemente, "n" oscila entre 440-460 unidades de óxido de etileno. Lo más preferiblemente, "n" es 454 unidades de óxido de etileno. Preferiblemente, el aptámero se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 8.

En las realizaciones más preferidas alternativas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



en la que "n" es aproximadamente 454 unidades de óxido de etileno (PEG = 20 kDa), y el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. "n" es aproximadamente 454 unidades de óxido de etileno porque el número de n puede variar ligeramente para un PEG que tiene un peso molecular particular. Preferiblemente, "n" oscila entre 400-500 unidades de óxido de etileno. Más preferiblemente, "n" oscila entre 425-475 unidades de óxido de etileno. Incluso más preferiblemente, "n" oscila entre 440-460 unidades de óxido de etileno. Lo más preferiblemente, "n" es 454 unidades de óxido de etileno. Preferiblemente, el aptámero se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1.

La invención también proporciona aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, los aptámeros tienen sustancialmente la misma estructura que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, los aptámeros tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI y sustancialmente la misma estructura que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. La invención también proporciona aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI y sustancialmente la misma capacidad para modular una función biológica de TFPI que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. La invención proporciona además aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI y sustancialmente la misma capacidad para modular la coagulación sanguínea que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. La invención también proporciona aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que tienen sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad para modular una función biológica de TFPI que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. La invención también proporciona aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que tienen sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad para modular la coagulación sanguínea que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, los aptámeros tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI, sustancialmente la misma estructura

y sustancialmente la misma capacidad para modular una función biológica de TFPI que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, los aptámeros tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI, sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad para modular la coagulación sanguínea que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

Los aptámeros frente a TFPI pueden comprender al menos una modificación química. Preferiblemente, la modificación se selecciona del grupo que consiste en: una sustitución química en una posición de azúcar, una sustitución química en una unión entre nucleótidos y una sustitución química en una posición de base. Alternativamente, la modificación se selecciona del grupo que consiste en: incorporación de un nucleótido modificado; una caperuza en 3'; una caperuza en 5'; conjugación con un compuesto no inmunogénico de alto peso molecular; conjugación con un compuesto lipófilo; incorporación de un motivo CpG; e incorporación de un fosforotioato o fosforoditioato en la estructura principal de fosfato. El compuesto no inmunogénico de alto peso molecular es preferiblemente polietilenglicol. En algunas realizaciones, el polietilenglicol es metoxipolietilenglicol (mPEG). La caperuza en 3' es preferiblemente una caperuza de desoxitimidina invertida.

La invención también proporciona aptámeros que se unen a TFPI y tienen una o más de las siguientes características: (i) incluye la secuencia de nucleótidos primaria de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mGmU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA (SEQ ID NO: 1); (ii) incluye una secuencia de nucleótidos primaria que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o 99 % con la secuencia de nucleótidos primaria mostrada en SEQ ID NO: 1 o 7; (iii) tiene una capacidad para unirse a TFPI sustancialmente igual o mejor que la de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos primaria seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y/o (iv) tiene una capacidad para modular o inhibir TFPI sustancialmente igual o mejor que la de un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos primaria seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Tal como se usa en el presente documento, el término secuencia de nucleótidos primaria se refiere a la secuencia lineal de 5' a 3' de bases nucleotídicas de la secuencia de ácido nucleico que forma un aptámero, sin tener en cuenta las modificaciones en 3' o 5'. Por ejemplo, ARC26835, ARC17480, ARC19498, ARC19499, ARC19500 y ARC19501 tienen todos ellos la misma secuencia de nucleótidos primaria.

La invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero frente a TFPI, tal como se define en las reivindicaciones, o una sal del mismo, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La divulgación proporciona además un método para tratar, prevenir, retardar la progresión de, o mejorar una patología, enfermedad o trastorno mediado por TFPI mediante la administración a un sujeto de la composición farmacéutica anterior. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. Más preferiblemente, el sujeto es un humano. Preferiblemente, la patología, enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en: deficiencias de factor de coagulación, congénitas o adquiridas, leves o moderadas o graves, incluyendo hemofilia A (deficiencia de factor VIII), hemofilia B (deficiencia de factor IX) y hemofilia C (deficiencia de factor XI); hemofilia A o B con inhibidores; otras deficiencias de factores (V, VII, X, XIII, protrombina, fibrinógeno); deficiencia de inhibidor de α 2-plasmina; deficiencia de inhibidor del activador de plasminógeno 1; deficiencia de múltiples factores; anomalías funcionales de factor (por ejemplo, disprotrombinemia); hemorragia de las articulaciones (hemartrosis), incluyendo, pero sin limitarse a, de tobillo, codo y rodilla; hemorragia espontánea en otras ubicaciones (muscular, gastrointestinal, bucal, etc.); accidente cerebrovascular hemorrágico; hemorragia intracraneal; laceraciones y otra hemorragia asociada con traumatismo; coagulopatía por traumatismo aguda; coagulopatía asociada con cáncer (por ejemplo, leucemia promielocítica aguda); enfermedad de von Willebrand; coagulación intravascular diseminada; enfermedad hepática; menorragia; trombocitopenia y hemorragia asociada con el uso de anticoagulantes (por ejemplo, antagonistas de vitamina K, antagonistas de FXa, etc.).

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante numerosas vías de administración. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía intravenosa (i.v.). Lo más preferiblemente, las composiciones se administran por vía subcutánea (s.c.).

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse usando diversos regímenes de tratamiento. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de tiempo definido, tal como cuando un paciente no está sufriendo un episodio hemorrágico. Alternativamente, las composiciones pueden administrarse a demanda, es decir, según sea necesario, tal como cuando un paciente está sufriendo un episodio hemorrágico. En una realización alternativa adicional, las composiciones pueden administrarse como una combinación de terapia de mantenimiento y terapia a demanda. En una realización de este tipo, las composiciones pueden administrarse como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de tiempo definido hasta que se produzca una hemorragia, en cuyo caso se aumentaría la dosificación de las composiciones según sea necesario hasta que se detenga la hemorragia, momento en el cual se disminuiría de nuevo la dosificación de las composiciones hasta el nivel de mantenimiento anterior. En otra realización de este tipo, las composiciones pueden administrarse como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de

tiempo definido hasta que se produzca una hemorragia, en cuyo caso se administraría al paciente otra terapia para trastorno hemorrágico (tal como factor VIII) hasta que se detenga la hemorragia, momento en el cual se interrumpiría la otra terapia para trastorno hemorrágico. Durante todo este tiempo, las composiciones continuarían administrándose como terapia de mantenimiento. Aún en otra realización de este tipo, las composiciones pueden administrarse como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de tiempo definido hasta que se produzca una hemorragia, en cuyo caso se disminuiría la dosificación de las composiciones y se administraría al paciente otra terapia para trastorno hemorrágico (tal como factor VIII) hasta que se detenga la hemorragia, momento en el cual se aumentaría de nuevo la dosificación de las composiciones hasta el nivel de mantenimiento anterior y se interrumpiría la otra terapia para trastorno hemorrágico. En otra realización de este tipo, puede administrarse otra terapia para trastorno hemorrágico (tal como factor VIII) como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de tiempo definido hasta que se produzca una hemorragia, en cuyo caso se administrarían las composiciones al paciente hasta que se detenga la hemorragia, momento en el cual se interrumpiría la terapia con las composiciones. Durante todo este tiempo, la otra terapia para trastorno hemorrágico continuaría administrándose como terapia de mantenimiento. Aún en otra realización de este tipo, puede administrarse otra terapia para trastorno hemorrágico (tal como factor VIII) como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de tiempo definido hasta que se produzca una hemorragia, en cuyo caso se disminuiría la dosificación de la otra terapia para trastorno hemorrágico y las composiciones se administrarían al paciente hasta que se detenga la hemorragia, momento en el cual se aumentaría de nuevo la dosificación de la otra terapia para trastorno hemorrágico hasta el nivel de mantenimiento anterior y se interrumpiría la terapia con las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse antes, durante y/o después de una intervención médica. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse conjuntamente con (antes, durante y/o después de) intervenciones médicas, tales como: profilaxis y/o tratamiento asociado con hemorragia producida por intervenciones dentales, cirugía ortopédica incluyendo, pero sin limitarse a artroplastia (por ejemplo, artroplastia de cadera), sinovioctomía quirúrgica o con radionúclidos (RSV), cirugía mayor, venopunción, transfusión y amputación.

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse en combinación con otro fármaco, tal como: concentrados de complejo protrombínico activado (APCC), actividad contrainhibidora del factor VIII (FEIBA[®]), factor VIIa recombinante (por ejemplo, NovoSeven[®]), factor VII recombinante (Advate[®], Kogenate[®], Recombinate[®], Helixate[®], ReFacto[®]), factor VII derivado de plasma (Humate P[®], Hemofil M[®]), factor IX recombinante (BeneFIX[®]), factor IX derivado de plasma (Bebulin VH[®], Konyne[®], Mononine[®]), crioprecipitado, acetato de desmopresina (DDAVP), ácido épsilon-aminocaproico o ácido tranexámico. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en combinación con otra terapia, tal como: transfusión de sangre o hemoderivados, plasmaféresis, terapia de inducción de tolerancia inmunitaria con altas dosis de factor de reemplazo, terapia de tolerancia inmunitaria con agentes inmunosupresores (por ejemplo, prednisona, rituximab) o terapia contra el dolor.

Los aptámeros frente a TFPI pueden usarse para la identificación de la proteína TFPI. Específicamente, los aptámeros frente a TFPI pueden usarse para identificar, cuantificar o detectar de otro modo la presencia de la proteína TFPI en una muestra, tal como una muestra biológica u otra muestra derivada del sujeto. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden usarse en ensayos *in vitro*, por ejemplo, ELISA, para detectar los niveles de TFPI en una muestra de paciente.

La invención también proporciona un método para regular TFPI en el que una molécula se une o interacciona de otro modo con una o más partes de TFPI, en el que al menos una parte está fuera de los dominios K1 y K2 de TFPI, tal como la región K3/C-terminal. La molécula es un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, la molécula puede unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Una molécula se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando la molécula se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Una molécula se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando la molécula se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Preferiblemente, la molécula se une al menos en parte a una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) que se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175, aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270, aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195, aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276. La molécula comprende preferiblemente una constante de disociación para TFPI humano, o una variante del mismo, de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, preferiblemente 50 nM o menos, preferiblemente 25 nM o menos, preferiblemente 10 nM o

menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, incluso más preferiblemente 1 nM o menos, y lo más preferiblemente 500 pM o menos.

La invención proporciona además el uso de un aptámero frente a TFPI, tal como se define en las reivindicaciones, en la fabricación de un medicamento en el tratamiento, prevención, retardo de progresión y/o mejora de un trastorno hemorrágico. Por ejemplo, ARC26835, ARC17480, ARC19498, ARC19499, ARC19500, ARC19501, ARC31301, (ARC18546, ARC19881 y ARC19882 se usan en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir, retardar la progresión de o mejorar de otro modo un trastorno hemorrágico.

En una realización, la invención proporciona un aptámero frente a TFPI, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en un método de tratamiento, prevención, retardo de progresión y/o mejora de un trastorno hemorrágico.

En una realización, la invención proporciona el uso de un aptámero frente a TFPI, tal como se define en las reivindicaciones, en la fabricación de una composición de diagnóstico o producto para su uso en un método de diagnóstico puesto en práctica en el cuerpo humano o de animal. En algunas realizaciones, el método de diagnóstico es para el diagnóstico de un trastorno hemorrágico.

En una realización, la invención proporciona un aptámero frente a TFPI, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en un método de diagnóstico puesto en práctica en el cuerpo humano o de animal. En algunas realizaciones, el método de diagnóstico es para el diagnóstico de un trastorno hemorrágico.

En una realización, la invención proporciona el uso de un aptámero frente a TFPI, tal como se define en las reivindicaciones, para el diagnóstico *in vitro*. En algunas realizaciones, el uso *in vitro* es para el diagnóstico de un trastorno hemorrágico.

La divulgación se refiere además a agentes que revierten los efectos de los aptámeros frente a TFPI, denominados en el presente documento "agentes de reversión de TFPI". El agente de reversión de TFPI puede ser cualquier tipo de molécula, tal como una proteína, anticuerpo, compuesto orgánico de molécula pequeña o un oligonucleótido. Preferiblemente, un agente de reversión de TFPI es un oligonucleótido que tiene 10-15 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, un agente de reversión de TFPI se une a un aptámero frente a TFPI. Preferiblemente, una unión de este tipo es a través de apareamiento de bases complementarias. Sin querer restringirse a la teoría, un agente de reversión de TFPI actúa hibridándose con un aptámero frente a TFPI, alterando de ese modo la estructura del aptámero frente a TFPI e impidiendo la unión del aptámero frente a TFPI a TFPI.

Los ejemplos de agentes de reversión de TFPI incluyen, pero no se limitan a: SEQ ID NO: 15, que es ARC23085; SEQ ID NO: 16, que es ARC23087; SEQ ID NO: 17, que es ARC23088; y SEQ ID NO: 18, que es ARC23089.

Preferiblemente, el agente de reversión de TFPI es un ácido nucleico que comprende la estructura expuesta a continuación:

mA-mG-mC-mC-mA-mA-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mC-mC (SEQ ID NO: 15), en la que "mN" es un residuo que contiene 2'-O-metilo (que también se conoce en la técnica como un residuo que contiene 2'-OMe, 2'-metoxi o 2'-OCH₃).

Alternativamente, el agente de reversión de TFPI es un ácido nucleico que comprende la estructura expuesta a continuación:

mU-mA-mU-mA-mU-mA-mC-mG-mC-mA-mC-mC-mU-mA-mA (SEQ ID NO: 16), en la que "mN" es un residuo que contiene 2'-O-metilo.

Alternativamente, el agente de reversión de TFPI es un ácido nucleico que comprende la estructura expuesta a continuación:

mC-mU-mA-mA-mC-mG-mA-mG-mC-mC (SEQ ID NO: 17), en la que "mN" es un residuo que contiene 2'-O-metilo.

Alternativamente, el agente de reversión de TFPI es un ácido nucleico que comprende la estructura expuesta a continuación:

mC-mA-mC-mC-mU-mA-mA-mC-mG-mA-mG-mC-mC-mA-mA (SEQ ID NO: 18), en la que "mN" es un residuo que contiene 2'-O-metilo.

La divulgación proporciona además un método para tratar, prevenir, retardar la progresión de y/o mejorar un trastorno hemorrágico, comprendiendo el método la etapa de administrar un agente de reversión de TFPI a un paciente que necesita tal tratamiento.

La divulgación proporciona el uso de un agente de reversión de TFPI en la fabricación de un medicamento para el

tratamiento, prevención, retardo de progresión y/o mejora de un trastorno hemorrágico.

Por consiguiente, la divulgación proporciona el uso de un agente de reversión de TFPI en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención, retardo de progresión y/o mejora de un trastorno hemorrágico en un paciente en el que el método implica administrar el agente de reversión de TFPI al paciente para controlar y/o modular el efecto terapéutico de un aptámero frente a TFPI administrado al paciente. El aptámero frente a TFPI puede administrarse antes que el agente de reversión de TFPI, simultáneamente con el agente de reversión de TFPI o después del agente de reversión de TFPI, y puede administrarse como parte de una terapia de combinación. Preferiblemente, el aptámero frente a TFPI se administra al paciente con el fin de tratar, prevenir, retardar la progresión y/o mejorar un trastorno hemorrágico en el paciente.

La divulgación también proporciona el uso de un agente de reversión de TFPI en la fabricación de un medicamento para su uso en el control y/o la modulación del tratamiento de un trastorno hemorrágico, en el que el trastorno hemorrágico está tratándose con un aptámero frente a TFPI.

En una realización, la divulgación proporciona un agente de reversión de TFPI para su uso en el tratamiento, prevención, retardo de progresión y/o mejora de un trastorno hemorrágico.

Por consiguiente, la divulgación proporciona un agente de reversión de TFPI para su uso en el tratamiento, prevención, retardo de progresión y/o mejora de un trastorno hemorrágico en un paciente en el que el método implica administrar el agente de reversión de TFPI al paciente para controlar y/o modular el efecto terapéutico de un aptámero frente a TFPI administrado al paciente.

La divulgación también proporciona un agente de reversión de TFPI para su uso en el tratamiento, prevención, retardo de progresión y/o mejora de un trastorno hemorrágico, en el que el trastorno hemorrágico está tratándose con un aptámero frente a TFPI.

En una realización, la divulgación proporciona el uso de un agente de reversión de TFPI en la fabricación de una composición de diagnóstico o producto para su uso en un método de diagnóstico puesto en práctica en el cuerpo humano o de animal. En algunas realizaciones, el método de diagnóstico es para el diagnóstico de un trastorno hemorrágico.

En una realización, la divulgación proporciona un agente de reversión de TFPI para su uso en un método de diagnóstico puesto en práctica en el cuerpo humano o de animal. En algunas realizaciones, el método de diagnóstico es para el diagnóstico de un trastorno hemorrágico.

En una realización, la divulgación proporciona el uso de un agente de reversión de TFPI para el diagnóstico *in vitro*. En algunas realizaciones, el uso *in vitro* es para el diagnóstico de un trastorno hemorrágico.

La invención también proporciona un kit que comprende al menos un recipiente que comprende una cantidad de uno o más aptámeros frente a TFPI, tal como se define en las reivindicaciones, junto con instrucciones para usar el uno o más aptámeros frente a TFPI en el tratamiento, prevención, retardo de progresión y/o mejora de un trastorno hemorrágico. Por ejemplo, el kit incluye ARC26835, ARC17480, ARC19498, ARC19499, ARC19500, ARC19501, ARC31301, ARC18546, ARC19881 o ARC19882 y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, los aptámeros se formulan como una composición farmacéutica. El kit puede comprender además un agente de reversión de TFPI, junto con instrucciones con respecto a la administración del agente de reversión.

La invención también proporciona un método para producir un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une a TFPI, comprendiendo el método la etapa de sintetizar químicamente un ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico de un aptámero que se une a TFPI tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender además la etapa de formular una composición farmacéutica mezclando la secuencia de ácido nucleico sintetizada, o una sal del mismo, con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La divulgación proporciona adicionalmente un método para producir un agente de reversión, comprendiendo el método la etapa de sintetizar químicamente un ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico de un agente de reversión de TFPI tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender además la etapa de formular una composición farmacéutica mezclando la secuencia de ácido nucleico sintetizada o una sal del mismo, con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona además aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se han identificado mediante el procedimiento SELEX™, que comprende las etapas de (a) poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos con TFPI en condiciones en las que se produce la unión; (b) separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido a TFPI; (c) amplificar los ácidos nucleicos unidos para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando; y, opcionalmente, (d) repetir las etapas de unir, separar y amplificar a través de tantos ciclos como se desee para obtener aptámero(s) que se une(n) a TFPI.

La invención proporciona además métodos para identificar aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes de TFPI, que comprenden las etapas de (a) poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos con una o más partes de TFPI en condiciones en las que se produce la unión; (b) separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido a TFPI; (c) amplificar los ácidos nucleicos unidos para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando; y, opcionalmente, (d) repetir las etapas de poner en contacto, separar y amplificar a través de tantos ciclos como se desee, para obtener aptámero(s) que se une(n) a una parte de TFPI. Este método también puede incluir ciclos intermedios o adicionales con unión a TFPI de longitud completa, seguido por separación y amplificación. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Preferiblemente, la una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175, aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270, aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195, aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276. El aptámero comprende preferiblemente una constante de disociación para TFPI humano o una variante o una o más partes del mismo, de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, preferiblemente 50 nM o menos, preferiblemente 25 nM o menos, preferiblemente 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, incluso más preferiblemente 1 nM o menos, y lo más preferiblemente 500 pM o menos.

La invención también proporciona métodos para identificar aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes de TFPI, que comprenden las etapas de (a) poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos con TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI en condiciones en las que se produce la unión; (b) separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido a TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI; (c) eluir específicamente los ácidos nucleicos unidos con una parte de TFPI, o un ligando que se une a TFPI de longitud completa o una parte de TFPI; (d) amplificar los ácidos nucleicos unidos para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando; y, opcionalmente, (e) repetir las etapas de poner en contacto, separar, eluir y amplificar a través de tantos ciclos como se desee para obtener aptámero(s) que se une(n) a una o más partes de TFPI. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Preferiblemente, la una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175, aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270, aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195, aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276. El aptámero comprende preferiblemente una constante de disociación para TFPI humano o una variante o una o más partes del mismo de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, preferiblemente 50 nM o menos, preferiblemente 25 nM o menos, preferiblemente 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, incluso más preferiblemente 1 nM o menos, y lo más preferiblemente 500 pM o menos.

La invención proporciona además métodos para identificar aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones,

que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes de TFPI, que comprenden las etapas de (a) poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos con TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI en condiciones en las que se produce la unión en presencia de un ligando de TFPI (un ligando que se une a TFPI) que bloquea que uno o más epítomos en TFPI se unan al aptámero; (b) separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido a TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI; (c) amplificar los ácidos nucleicos unidos para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando; y, opcionalmente, (d) repetir las etapas de poner en contacto, separar y amplificar a través de tantos ciclos como se desee para obtener aptámero(s) que se une(n) a una o más partes de TFPI. En otras realizaciones de este método, puede producirse la inclusión de un ligando de TFPI que bloquea que una o más partes en TFPI se unan al aptámero durante la etapa de puesta en contacto, la etapa de separación, o ambas. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Preferiblemente, la una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175, aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270, aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195, aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276. El aptámero comprende preferiblemente una constante de disociación para TFPI humano o una variante o una o más partes del mismo de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, preferiblemente 50 nM o menos, preferiblemente 25 nM o menos, preferiblemente 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, incluso más preferiblemente 1 nM o menos, y lo más preferiblemente 500 pM o menos.

La invención proporciona además métodos para identificar aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes de TFPI, que comprenden las etapas de (a) poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos con TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI en condiciones en las que se produce la unión; (b) separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido a TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI; (c) separar los ácidos nucleicos unidos que tienen una propiedad funcional deseada de los ácidos nucleicos unidos que no tienen una propiedad funcional deseada; (d) amplificar los ácidos nucleicos unidos que tienen una propiedad funcional deseada para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando; y, opcionalmente, (e) repetir las etapas de poner en contacto, separar, eluir y amplificar a través de tantos ciclos como se desee para obtener aptámero(s) que se une(n) a una o más partes de TFPI. Las etapas (b) y (c) pueden producirse secuencial o simultáneamente. Preferiblemente, la propiedad funcional deseada es la inhibición de la interacción de TFPI con FXa, FVIIa, receptor de TFPI o el glucocálix. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Preferiblemente, la una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175, aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270, aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195, aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276. El aptámero comprende preferiblemente una constante de disociación para TFPI humano o una variante o una o más partes del mismo de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, preferiblemente 50 nM o menos,

preferiblemente 25 nM o menos, preferiblemente 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, incluso más preferiblemente 1 nM o menos, y lo más preferiblemente 500 pM o menos.

- 5 La invención también proporciona un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une a un polipéptido de inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en el que el aptámero modula la inhibición mediada por TFPI de la coagulación sanguínea, y en el que el aptámero compite por unirse a TFPI con un aptámero de referencia que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 4 (ARC19499), SEQ ID NO: 1 (ARC26835), SEQ ID NO: 2 (ARC17480), SEQ ID NO: 3 (ARC19498), SEQ ID NO: 5 (ARC19500), SEQ ID NO: 6 (ARC19501), SEQ ID NO: 7 (ARC31301), SEQ ID NO: 8 (ARC18546), SEQ ID NO: 9 (ARC19881) y SEQ ID NO: 10 (ARC19882). Preferiblemente, el aptámero de referencia comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 (ARC19499).
- 10
- 15 La invención proporciona además un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une a un polipéptido de inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en el que el aptámero se une a una parte lineal o una parte conformacional de TFPI en el que al menos una parte de la región reconocida por el aptámero es diferente de la región de TFPI a la que se une el factor VIIa, el factor Xa, o tanto el factor VIIa como el factor Xa. Preferiblemente, el aptámero se une a una o más regiones que comprenden al menos una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 seleccionada del grupo que consiste en: los residuos de aminoácido 148-170, residuos de aminoácido 150-170, residuos de aminoácido 155-175, residuos de aminoácido 160-180, residuos de aminoácido 165-185, residuos de aminoácido 170-190, residuos de aminoácido 175-195, residuos de aminoácido 180-200, residuos de aminoácido 185-205, residuos de aminoácido 190-210, residuos de aminoácido 195-215, residuos de aminoácido 200-220, residuos de aminoácido 205-225, residuos de aminoácido 210-230, residuos de aminoácido 215-235, residuos de aminoácido 220-240, residuos de aminoácido 225-245, residuos de aminoácido 230-250, residuos de aminoácido 235-255, residuos de aminoácido 240-260, residuos de aminoácido 245-265, residuos de aminoácido 250-270, residuos de aminoácido 255-275, residuos de aminoácido 260-276, residuos de aminoácido 148-175, residuos de aminoácido 150-175, residuos de aminoácido 150-180, residuos de aminoácido 150-185, residuos de aminoácido 150-190, residuos de aminoácido 150-195, residuos de aminoácido 150-200, residuos de aminoácido 150-205, residuos de aminoácido 150-210, residuos de aminoácido 150-215, residuos de aminoácido 150-220, residuos de aminoácido 150-225, residuos de aminoácido 150-230, residuos de aminoácido 150-235, residuos de aminoácido 150-240, residuos de aminoácido 150-245, residuos de aminoácido 150-250, residuos de aminoácido 150-255, residuos de aminoácido 150-260, residuos de aminoácido 150-265, residuos de aminoácido 150-270, residuos de aminoácido 150-275, residuos de aminoácido 150-276, residuos de aminoácido 190-240, residuos de aminoácido 190-276, residuos de aminoácido 240-276, residuos de aminoácido 242-276, residuos de aminoácido 161-181, residuos de aminoácido 162-181, residuos de aminoácido 182-240, residuos de aminoácido 182-241 y residuos de aminoácido 182-276. Más preferiblemente, el aptámero compite con un aptámero de referencia que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 (ARC19499) para unirse a TFPI.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40 La invención también proporciona un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une a la misma región en un polipéptido de inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 como la región a la que se une un aptámero frente a TFPI que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 (ARC19499).
- 45
- 50 La invención proporciona además un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une a una región en un polipéptido de inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano que comprende una o más partes de (SEQ ID NO: 11, en el que la una o más partes se selecciona del grupo que consiste en: los residuos de aminoácido 148-170, residuos de aminoácido 150-170, residuos de aminoácido 155-175, residuos de aminoácido 160-180, residuos de aminoácido 165-185, residuos de aminoácido 170-190, residuos de aminoácido 175-195, residuos de aminoácido 180-200, residuos de aminoácido 185-205, residuos de aminoácido 190-210, residuos de aminoácido 195-215, residuos de aminoácido 200-220, residuos de aminoácido 205-225, residuos de aminoácido 210-230, residuos de aminoácido 215-235, residuos de aminoácido 220-240, residuos de aminoácido 225-245, residuos de aminoácido 230-250, residuos de aminoácido 235-255, residuos de aminoácido 240-260, residuos de aminoácido 245-265, residuos de aminoácido 250-270, residuos de aminoácido 255-275, residuos de aminoácido 260-276, residuos de aminoácido 148-175, residuos de aminoácido 150-175, residuos de aminoácido 150-180, residuos de aminoácido 150-185, residuos de aminoácido 150-190, residuos de aminoácido 150-195, residuos de aminoácido 150-200, residuos de aminoácido 150-205, residuos de aminoácido 150-210, residuos de aminoácido 150-215, residuos de aminoácido 150-220, residuos de aminoácido 150-225, residuos de aminoácido 150-230, residuos de aminoácido 150-235, residuos de aminoácido 150-240, residuos de aminoácido 150-245, residuos de aminoácido 150-250, residuos de aminoácido 150-255, residuos de aminoácido 150-260, residuos de aminoácido 150-265, residuos de aminoácido 150-270, residuos de aminoácido 150-275, residuos de aminoácido 150-276, residuos de aminoácido 190-240, residuos de aminoácido 190-276, residuos de aminoácido 240-276, residuos de aminoácido 242-276, residuos de aminoácido 161-181, residuos de aminoácido 162-181, residuos de aminoácido 182-240, residuos de aminoácido 182-241 y residuos de aminoácido 182-276.
- 55
- 60
- 65

La invención proporciona adicionalmente un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano y muestra una o más de las siguientes propiedades: a) compite por unirse a TFPI con una cualquiera de SEQ ID NO: 1-10; b) inhibe la inhibición de TFPI del factor Xa; c) aumenta la generación de trombina en plasma de hemofilia; d) inhibe la inhibición de TFPI del complejo tenasa intrínseco; e) restablece la hemostasia normal, tal como se mide mediante tromboelastografía (TEG[®]) en sangre completa y plasma; f) restablece la coagulación normal, tal como se indica mediante un tiempo de formación de coágulo más corto, formación de coágulo más rápida o desarrollo de coágulo más estable, tal como se mide mediante tromboelastografía (TEG[®]) o tromboelastometría rotacional (ROTEM) en sangre completa y plasma; o g) disminuye el tiempo de formación de coágulo, tal como se mide mediante tiempo de protrombina con dilución (dPT), tiempo de coagulación activada por factor tisular (TF-ACT) o cualquier otra medición del tiempo de formación de coágulo sensible a TFPI.

La invención también proporciona un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano en el que el aptámero compite por unirse a TFPI con un aptámero de referencia seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

La invención proporciona además un aptámero que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) en el que el aptámero compite directamente por unirse a TFPI con un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: AD4903.

La invención también proporciona un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano y comprende un motivo de tallo y bucle que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, en el que: a) uno cualquiera o más de los nucleótidos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 13, 17, 20, 21, 22, 24, 28, 30 y 32 puede estar modificado de una sustitución 2'-OMe a una sustitución 2'-desoxi; b) uno cualquiera o más de los nucleótidos 5, 7, 15, 19, 23, 27, 29 y 31 puede estar modificado de un 2'-OMe-uracilo a o bien un 2'-desoxi-uracilo o bien una 2'-desoxi-timina; c) el nucleótido 18 puede estar modificado de un 2'-OMe-uracilo a un 2'-desoxi-uracilo; y/o d) uno cualquiera o más de los nucleótidos 14, 16 y 25 puede estar modificado de una 2'-desoxi-citosina a o bien una 2'-OMe-citosina o bien una 2'-fluoro-citosina.

La invención proporciona adicionalmente un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano y comprende los nucleótidos 7-28 de SEQ ID NO: 2.

La divulgación proporciona además un método para tratar un trastorno hemorrágico que comprende administrar uno cualquiera de los aptámeros anteriores.

La invención proporciona además un aptámero que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), en el que el aptámero comprende una secuencia primaria de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática de la cascada de coagulación.

La figura 2 es una ilustración de las formas de TFPI, que se asocian con el endotelio vascular o en la mezcla de plasmas.

La figura 3 es una representación esquemática de las dos formas de TFPI encontradas en el endotelio, (figura 3A) TFPI α y (figura 3B) TFPI β .

La figura 4 es una representación esquemática del proceso de selección de aptámeros *in vitro* (SELEX[™]) de mezclas de oligonucleótidos de secuencia al azar.

La figura 5 es una ilustración de la secuencia de aminoácidos de la proteína TFPI humana madura.

La figura 6 es una ilustración de un PEG ramificado de 40 kDa.

La figura 7 es una ilustración de un PEG ramificado de 40 kDa que está unido al extremo 5' terminal de un aptámero de amina.

La figura 8 es una ilustración de un PEG ramificado de 40 kDa que está unido al extremo 5' terminal de un aptámero que usa una fosoramidita con ligador de 5-amina.

La figura 9A es una ilustración de un PEG ramificado de 40 kDa que está unido al extremo 5' terminal de un aptámero que usa una fosoramidita con ligador de 5'-hexilamina. La figura 9B es una ilustración alternativa de un PEG ramificado de 40 kDa que está unido al extremo 5' terminal de un aptámero que usa una fosoramidita con

ligador de 5'-hexilamina.

La figura 10A es una ilustración de un aptámero frente a TFPI, que comprende 2'-O-metil- (círculos) y 2'-desoxi- (cuadrados) nucleótidos y está modificado en su extremo 5-terminal con un resto PEG de 40 kDa y en su extremo 3'-terminal con un residuo de desoxitimidina invertida (3T, que también se conoce en la técnica como idT). La figura 10B es una ilustración de un aptámero frente a TFPI, que comprende 2'-O-metil- (círculos) y 2'-desoxi- (cuadrados) nucleótidos y está modificado en su extremo 5-terminal con un resto PEG de 40 kDa y un ligador, y en su extremo 3'-terminal con un residuo de desoxitimidina invertida (3T). La figura 10C es una ilustración de la estructura probable de ARC19499, que comprende 2'-O-metil- (círculos) y 2'-desoxi- (cuadrados) nucleótidos y está modificado en su extremo 5-terminal con un resto PEG de 40 kDa ramificado y un ligador que contiene fosfato de hexilamina, y en su extremo 3'-terminal con un residuo de desoxitimidina invertida (3T).

La figura 11 es una ilustración que representa diversas estrategias de pegilación, tales como monopegilación convencional, pegilación múltiple y oligomerización a través de pegilación.

La figura 12A es un gráfico que muestra que ARC17480 se une estrechamente a TFPI de longitud completa. Los datos se ajustan a modelos tanto monofásicos como bifásicos para determinar una K_D para la unión. La figura 12B es un gráfico que muestra que el ARNt cambia la afinidad de ARC17480 por TFPI. El aptámero todavía se une estrechamente a TFPI en presencia de ARNt, lo que indica que la unión de ARC17480 a TFPI es específica.

La figura 13 representa los resultados de experimentos de competencia de unión con ARC17480 radiomarcado, TFPI de longitud completa y diversos aptámeros no marcados. ARC17480 y ARC19499 (figura 13A); ARC19498 (figura 13B), ARC18546 (figura 13C); ARC26835 y ARC31301 (figura 13D); ARC19500, ARC19501, ARC19881 y ARC19882 (figura 13E) no marcados compiten todos ellos por unirse con ARC17480 radiomarcado.

La figura 14 es un conjunto de gráficos que muestran experimentos de unión con ARC17480 y diversas proteínas, incluyendo factores de coagulación, inhibidores de proteasa y zimógenos de coagulación. La figura 14A es un gráfico de un experimento de unión con ARC17480 y diversas proteínas. La figura 14B es un gráfico de un experimento de unión con ARC17480 y TFPI o diversos factores de coagulación activados. La figura 14C es un gráfico de un experimento de unión con ARC17480 y TFPI o diversos inhibidores de proteasa. La figura 14D es un gráfico de un experimento de unión con ARC17480 y TFPI o diversos zimógenos de coagulación. ARC17480 mostró unión significativa a TFPI, pero no a ninguna de las otras proteínas sometidas a prueba.

La figura 15 es un gráfico que muestra datos de un ensayo basado en placas que demuestra la unión de ARC19499 a TFPI recombinante.

La figura 16 es un gráfico que muestra datos de un ensayo de competencia basado en placas que demuestra la unión de ARC19498 a TFPI en competencia con ARC19499.

La figura 17A representa los resultados de un ensayo de unión con ARC17480 radiomarcado, TFPI de longitud completa y TFPI-His. La figura 17B representa los resultados de un ensayo de unión con ARC17480 radiomarcado, TFPI de longitud completa, TFPI-K1K2 truncado, proteína de dominio K3-C-terminal de TFPI, y el péptido que contiene la región C-terminal de TFPI en presencia de neutraavidina.

La figura 18A representa los resultados de un ensayo de unión con ARC17480 radiomarcado y TFPI de longitud completa en ausencia o presencia de heparina 0,1 mg/ml. La figura 18B representa los resultados de un ensayo de competencia de unión con ARC17480 radiomarcado, TFPI de longitud completa 12,5 nM y diferentes concentraciones de heparina y heparina de bajo peso molecular (LMWH) como competidores.

Las figuras 19, A y B, ilustran la competencia de diversos anticuerpos anti-TFPI con ARC19499 en un ensayo de unión basado en placas.

Las figuras 20, A, B y C, ilustran la competencia de diversos anticuerpos anti-TFPI con ARC19499 en un ensayo de filtración de nitrocelulosa (transferencia puntual).

La figura 21 es una serie de gráficos que muestran la actividad de ARC19499 en el ensayo de inhibición de Xasa extrínseco. En la figura 21A, se representó gráficamente la velocidad (mDO/min) frente al tiempo (minutos). En ausencia de TFPI, la velocidad era lineal. TFPI 1 nM disminuyó la velocidad drásticamente. Concentraciones crecientes de ARC19499 desde 0,01 hasta 1000 nM aumentaron la velocidad de manera dependiente de la dosis hasta casi el nivel de ausencia de TFPI. En la figura 21B, las velocidades en el punto de tiempo de 4 minutos se normalizaron a la velocidad en ausencia de TFPI a los 4 minutos. ARC19499 mostró una mejora dependiente de la dosis en la velocidad del ensayo, alcanzando niveles próximos a los de ausencia de TFPI por aptámero 10 nM. Los datos para la figura 21A fueron representativos de tres experimentos. Los datos para la figura 21B representan la media $\pm$ error estándar, $n=3$.

Las figuras 22, A-C representan los resultados de un ensayo de actividad del factor Xa (FXa) con TFPI de longitud

completa y ARC17480, ARC18546, ARC26835, ARC31301, ARC19498, ARC19499, ARC19500, ARC19501, ARC19881 o ARC19882. Se representa gráficamente la velocidad ajustada de degradación de sustrato de FXa en función de la concentración de aptámero. Las velocidades se ajustan restando de la velocidad observada con FXa y TFPI en ausencia de aptámero. Todos los aptámeros inhiben TFPI, lo que da como resultado un aumento en la actividad de FXa dependiente de la concentración en este ensayo.

La figura 23 es un gráfico que muestra la protección de la actividad del factor Xa (FXa) por ARC19499 de la inhibición de TFPI en un ensayo cromogénico de la actividad de FXa.

La figura 24 es un gráfico que muestra la protección del FXasa extrínseco por ARC19499 de la inhibición de TFPI en un ensayo cromogénico de activación del factor X (FX).

La figura 25 es un gráfico que muestra la protección del complejo TF:FVIIa por ARC19499 de la inhibición de TFPI en un ensayo fluorogénico de la actividad de TF:FVIIa.

La figura 26 es un gráfico que muestra el efecto de ARC19499 sobre la generación de trombina iniciada por el factor tisular (TF) en un proteoma de coagulación sintético normal (SCP).

La figura 27 es un gráfico que muestra el efecto de ARC19499 sobre la generación de trombina iniciada por el factor tisular (TF) en un proteoma de coagulación de hemofilia A.

La figura 28 es un gráfico que muestra el efecto de ARC19499 sobre la generación de trombina iniciada por el factor tisular (TF) en un proteoma de coagulación de hemofilia B.

La figura 29 es un gráfico que muestra el efecto de aumentar las concentraciones del factor VIII (FVIII) sobre la generación de trombina iniciada por el factor tisular (TF) en ausencia de ARC19499.

La figura 30 es un gráfico que muestra el efecto de aumentar las concentraciones del factor VIII (FVIII) sobre la generación de trombina iniciada por el factor tisular (TF) en presencia de ARC19499 1,0 nM.

La figura 31 es un gráfico que muestra el efecto de aumentar las concentraciones del factor VIII (FVIII) sobre la generación de trombina iniciada por el factor tisular (TF) en presencia de ARC19499 2,5 nM.

La figura 32 es un gráfico que muestra el efecto de aumentar las concentraciones de ARC19499 sobre la generación de trombina iniciada por el factor tisular (TF) en ausencia de factor VIII (FVIII).

La figura 33 es un gráfico que muestra el efecto de aumentar las concentraciones de ARC19499 sobre la generación de trombina iniciada por el factor tisular (TF) en presencia de factor VIII (FVIII) al 100 %.

La figura 34 es un gráfico que muestra el efecto de aumentar las concentraciones de ARC19499 sobre la generación de trombina iniciada por el factor tisular (TF) en presencia de factor VIII (FVIII) al 2 %.

La figura 35 es un gráfico que muestra el efecto de aumentar las concentraciones de ARC19499 sobre la generación de trombina iniciada por el factor tisular (TF) en presencia de factor VIII (FVIII) al 5 %.

La figura 36 es un gráfico que muestra el efecto de aumentar las concentraciones de ARC19499 sobre la generación de trombina iniciada por el factor tisular (TF) en presencia de factor VIII (FVIII) al 40 %.

La figura 37 es una serie de gráficos que muestran la actividad de ARC19499 en el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT) en plasma normal mezclado (PNP) iniciado con factor tisular 0,1 pM (TF; figura 37A) o TF 1,0 pM (figura 37B). El potencial de trombina endógeno (ETP; figura 37C) y la trombina pico (figura 37D) mostraron ambos un aumento dependiente de la dosis con concentraciones crecientes de ARC19499 a ambas concentraciones de TF. El tiempo de demora (figura 37E) mostró una disminución dependiente de la dosis con concentraciones crecientes de ARC19499 a ambas concentraciones de TF.

La figura 38 es una serie de gráficos que muestran la actividad de ARC19499 en el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT) en plasma empobrecido en TFPI iniciado con factor tisular (TF) 0,01, 0,1 o 1,0 pM. La figura 38A muestra curvas de generación de trombina a concentraciones crecientes de ARC19499 con tres concentraciones de TF diferentes. El potencial de trombina endógeno (ETP; figura 38B), la trombina pico (figura 38C) y el tiempo de demora (figura 38D) mostraron poco o ningún cambio con respecto a todas las concentraciones de ARC19499 sometidas a prueba en todas las concentraciones de TF sometidas a prueba.

La figura 39 es una serie de gráficos que muestran la actividad de ARC19499 en el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT) en plasma normal mezclado (PNP) tratado previamente con un anticuerpo neutralizante, policlonal anti-TFPI. El ensayo se inició con factor tisular 0,01 pM (TF; figura 39A), TF 0,1 pM (figura 39B) o TF 1,0 pM (figura 39C). El potencial de trombina endógeno (ETP; figura 39D), la trombina pico (figura 39E) y

el tiempo de demora (figura 39F) permanecieron en gran medida sin cambios en todas las concentraciones de ARC19499 independientemente de la concentración de TF.

La figura 40 es una serie de gráficos que muestran un ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT) con ARC17480 (figura 40A), ARC19498 (figura 40B) y ARC19499 (figura 40C) a diversas concentraciones. El potencial de trombina endógeno (ETP; figura 40D) y la trombina pico (figura 40E) medidos con diversas concentraciones de ARC17480, ARC19498 y ARC19499 en plasma de hemofilia A fueron similares entre sí, teniendo ARC19499 una reactividad ligeramente mayor, alcanzando una meseta de ETP cerca de los niveles de plasma normales mediante aptámero 30 nM. Las curvas de generación de trombina (figura 40A-C) son datos representativos. Los datos de ETP (figura 40D) y trombina pico (figura 40E) representan la media $\pm$ error estándar, n=3.

La figura 41 es un gráfico de generación de trombina en plasma normal desplaquetado de un solo voluntario sano. Se trató el plasma con un anticuerpo anti-FVIII para generar un estado similar a la hemofilia A. ARC19499 mostró un aumento dependiente de la dosis en la generación de trombina en el plasma tratado con anticuerpo.

La figura 42 es una serie de gráficos que muestran un ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT) con ARC19499 (figura 42A) y ARC17480 (figura 42B) a diversas concentraciones en plasma de hemofilia B.

La figura 43 es una serie de gráficos que muestran el efecto de ARC19499 (rombos) y ARC 17480 (triángulos) sobre el potencial de trombina endógeno (ETP), trombina pico y tiempo de demora en plasma de hemofilia B. La línea continua designa el nivel de cada parámetro en ausencia de cualquier fármaco. La línea rayada designa el nivel de cada parámetro en plasma normal mezclado (PNP) sin ningún fármaco adicional. Los datos representan la media $\pm$ error estándar, n=3. Ambos aptámeros se comportaron de manera muy similar entre sí en plasma de hemofilia B.

La figura 44 es una serie de gráficos que muestran los efectos de ARC19499 en comparación con un aptámero de control negativo sobre la generación de trombina tal como se mide mediante el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT) en plasmas de pacientes con hemofilia A (figura 44A), hemofilia A con inhibidores (figura 44B) o hemofilia B (figura 44C). Los resultados se dan en lo que se refiere al tiempo de demora (izquierda), potencial de trombina endógeno (ETP) (en medio) y la concentración de trombina pico (derecha). En todos los gráficos, las líneas representan la actividad del plasma normal (continua) y el plasma deficiente en factor (discontinua) en ausencia de aptámero, y el sombreado alrededor de las líneas representa el error estándar de la media.

La figura 45 representa los resultados de experimentos de generación de trombina con ARC17480, ARC18546, ARC26835 y ARC31301 en plasma de hemofilia A. Se representan gráficamente los valores del potencial de trombina endógeno ajustado (ETP; figura 45A y C) y la trombina pico ajustada (figura 45B y D) en función de la concentración de aptámero. El ETP y los valores de trombina pico para plasma de hemofilia se restaron de cada valor para dar los valores ajustados. ARC17480, ARC18546, ARC26835 y ARC31301 aumentan la generación de trombina de manera dependiente de la concentración en plasma de hemofilia A.

La figura 46 representa los resultados de experimentos de generación de trombina con ARC17480, ARC19500, ARC19501, ARC19881 y ARC19882 en plasma de hemofilia A. Se representan gráficamente los valores de potencial de trombina endógeno ajustado (ETP; figura 46A) y trombina pico ajustada (figura 46B) en función de la concentración de aptámero. Los valores de ETP y trombina pico para plasma de hemofilia se restaron de cada valor para dar los valores ajustados. ARC17480, ARC19500, ARC19501, ARC19881 y ARC19882 aumentan la generación de trombina de manera dependiente de la concentración en plasma de hemofilia A.

La figura 47 es una serie de gráficos de experimentos de generación de trombina que muestran el efecto de NovoSeven® (triángulos en blanco) y ARC19499 (rombos rellenos) sobre el potencial de trombina endógeno (ETP; figura 47A), la trombina pico (figura 47B) y el tiempo de demora (figura 47C) en plasma normal. La línea negra continua designa el nivel de cada parámetro en ausencia de cualquier fármaco. Los datos representan la media $\pm$ error estándar, n=3.

La figura 48 es una serie de gráficos de experimentos de generación de trombina que muestran el efecto de NovoSeven® (triángulos en blanco) y ARC19499 (rombos rellenos) sobre el potencial de trombina endógeno (ETP; figura 48A), la trombina pico (figura 48B) y el tiempo de demora (figura 48C) en plasma de hemofilia A. La línea negra continua designa el nivel de cada parámetro en ausencia de cualquier fármaco. La línea discontinua designa el nivel de cada parámetro en plasma normal mezclado (PNP) sin ningún fármaco adicional. Los datos representan la media $\pm$ error estándar, n=3.

La figura 49 es una serie de gráficos de experimentos de generación de trombina que muestran el efecto de NovoSeven® (triángulos en blanco) y ARC19499 (rombos rellenos) sobre el potencial de trombina endógeno (ETP; figura 49A), la trombina pico (figura 49B) y el tiempo de demora (figura 49C) en plasma con inhibidor de hemofilia A. La línea negra continua designa el nivel de cada parámetro en ausencia de cualquier fármaco. La línea discontinua designa el nivel de cada parámetro en plasma normal mezclado (PNP) sin ningún fármaco adicional. Los datos

representan la media $\pm$ error estándar, $n=3$.

La figura 50 es una serie de gráficos de experimentos que muestran el efecto de NovoSeven® (triángulos en blanco) y ARC19499 (rombos rellenos) sobre el valor de R (figura 50A), el ángulo (figura 50B) y la amplitud máxima (MA; figura 50C) en un ensayo de tromboelastografía (TEG®) en sangre completa con citrato de voluntarios sanos. La línea negra continua designa el nivel de cada parámetro en ausencia de cualquier fármaco. Los datos representan la media $\pm$ error estándar, $n=3$.

La figura 51 es una serie de gráficos de experimentos que muestran el efecto de NovoSeven® (triángulos en blanco) y ARC19499 (rombos rellenos) sobre el valor de R (figura 51A), el ángulo (figura 51B) y la amplitud máxima (MA; figura 51C) en un ensayo de tromboelastografía (TEG®) en sangre completa con citrato de voluntarios sanos tratada con un anticuerpo anti-FVIII. La línea negra continua designa el nivel de cada parámetro en ausencia de cualquier fármaco. La línea discontinua designa el nivel de cada parámetro en sangre completa no tratada con anticuerpo. Los datos representan la media $\pm$ error estándar, $n=3$.

La figura 52 es una serie de gráficos de experimentos de tromboelastografía que muestran el tiempo de demora (figura 52A), la trombina pico (figura 52B) y el potencial de trombina endógeno (ETP; figura 52C). Cada línea representa la respuesta a la dosis de ARC19499 en presencia de un porcentaje diferente de factor VIII (rombos rellenos, 0 %; triángulos en blanco, 1,4 %; cuadrados rellenos, 2,5 %; triángulos rellenos, 5 %; cuadrados en blanco, 14 %; y círculos rellenos, 140 %). La línea discontinua designa el nivel de cada parámetro en presencia de plasma normal mezclado (PNP) solo. La línea continua designa el nivel de cada parámetro en plasma de hemofilia A sin ninguna adición. Los datos representan la media $\pm$ error estándar, $n=3$.

La figura 53 es una serie de gráficos de experimentos de generación de trombina que demuestran la actividad de ARC19499 en plasma con diversas concentraciones de factor VIII (FVIII). En la figura 53A, se representa gráficamente el potencial de trombina endógeno (ETP) en función de la concentración de ARC19499. Las líneas discontinuas representan el ETP tras la adición de diferentes cantidades de FVIII a plasma de hemofilia A. Las líneas continuas muestran que ARC19499 aumenta el ETP en plasma de hemofilia A (línea con triángulos) y en plasma de hemofilia A con FVIII al 5 % añadido (línea con rombos). En la figura 53B, se representa gráficamente el ETP frente a la concentración de FVIII. Se muestran los datos de ETP con y sin la adición de ARC19499 300 nM.

La figura 54 ilustra el diseño experimental del modelo espacial de coagulación.

La figura 54A es un diagrama de la cámara espacial de coagulación. La figura 54B es una ilustración esquemática de los componentes del sistema para medir la progresión del coágulo en la cámara.

La figura 55 muestra dos gráficos que ilustran la propagación de coágulos en el modelo espacial de coagulación, tal como se mide mediante dispersión de la luz, representado gráficamente en función de la distancia desde la superficie de activación. La coagulación se activó mediante factor tisular de baja densidad en plasma mezclado normal en ausencia (figura 55A) y en presencia (figura 55B) de ARC19499 300 nM.

La figura 56 es un gráfico del tamaño del coágulo frente al tiempo, en ausencia (línea negra gruesa) y presencia (línea gris fina) de ARC19499 300 nM en plasma mezclado normal. Los parámetros que pueden deducirse de este gráfico incluyen el tiempo de demora (tiempo hasta el comienzo del crecimiento del coágulo), la velocidad inicial (α o V_{inicial} ; la pendiente media durante los primeros 10 minutos de crecimiento), la velocidad estacionaria (β o $V_{\text{estacionaria}}$; la pendiente media durante los siguientes 30 minutos de crecimiento) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (un parámetro integral de la eficacia de formación de coágulo).

La figura 57 es una serie de gráficos que muestran el tiempo de demora (figura 57A), la V_{inicial} (figura 57B), la $V_{\text{estacionaria}}$ (figura 57C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 57D) en plasma mezclado normal, representado gráficamente cada uno en función de la densidad de factor tisular en presencia (círculos) y ausencia (cuadrados) de ARC19499.

La figura 58 es una serie de gráficos que muestran el tiempo de demora (figura 58A), la V_{inicial} (figura 58B), la $V_{\text{estacionaria}}$ (figura 58C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 58D) en plasma mezclado normal, representado gráficamente cada uno en función de la concentración de ARC19499 en condiciones de baja densidad de factor tisular de superficie.

La figura 59 es una serie de gráficos que ilustran el efecto de ARC19499 sobre el tiempo de demora (figura 59A), la V_{inicial} (figura 59B), la $V_{\text{estacionaria}}$ (figura 59C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 59D) en plasma mezclado normal en condiciones de baja densidad de factor tisular de superficie. Un asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa $\pm$ ARC19499 ($P<0,05$).

La figura 60 es una serie de gráficos que muestran el tiempo de demora (figura 60A), la V_{inicial} (figura 60B), la $V_{\text{estacionaria}}$ (figura 60C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 60D) en plasma mezclado normal,

representado gráficamente cada uno en función de la concentración de ARC19499 en condiciones de densidad media de factor tisular de superficie.

5 La figura 61 es una serie de gráficos que ilustran el efecto de ARC19499 sobre el tiempo de demora (figura 61A), la V_{inicial} (figura 61B), la $V_{\text{estacionaria}}$ (figura 61C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 61D) en plasma mezclado normal en condiciones de densidad media de factor tisular de superficie. Un asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa $\pm$ ARC19499 ($P < 0,05$).

10 La figura 62 compara la propagación de coágulos en plasma mezclado normal (figura 62A) con plasma mezclado normal que contiene ARC19499 100 nM (figura 62B) o factor VIIa recombinante 100 nM (Villar o Novoseven[®]; figura 62C) en condiciones de baja densidad de factor tisular de superficie.

15 La figura 63 es una ilustración que muestra una serie de imágenes de dispersión de la luz del modelo espacial de coagulación. Cada fila representa la propagación de coágulos desde una superficie (parte inferior) a lo largo del tiempo de 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. La fila superior muestra la propagación de coágulos en plasma de hemofilia A grave, seguido por plasma de hemofilia A grave que contiene ARC19499 100 nM en la segunda fila y plasma de hemofilia A grave que contiene factor VIIa recombinante (Villar) 100 nM en la tercera fila.

20 La figura 64 es un gráfico del tamaño del coágulo frente al tiempo, en plasma normal (línea discontinua, gris oscura), plasma de hemofilia A grave (línea continua negra), plasma de hemofilia A grave que contiene ARC19499 100 nM (línea continua, gris claro) o factor VIIa recombinante (Villar) 100 nM (línea discontinua, gris claro).

25 La figura 65 es una tabla que resume los datos demográficos de pacientes con hemofilia A de los que se extrajeron muestras de plasma para experimentos espaciales de formación de coágulo.

30 La figura 66 muestra los efectos de ARC19499 o factor VIIa recombinante (Villar), titulado en plasma de hemofilia A grave del paciente 1, sobre la formación espacial de coágulo activada con baja densidad de factor tisular de superficie. Los efectos de ARC19499 y Villar sobre el tiempo de demora se representan en las figuras 66A y B, respectivamente, mientras que los efectos de ARC19499 y Villar sobre la V_{inicial} se representan en las figuras 66C y D, respectivamente. La figura 67 muestra los efectos de ARC19499 o factor VIIa recombinante (Villar), titulado en plasma de hemofilia A grave del paciente 2, sobre la formación espacial de coágulo activada con baja densidad de factor tisular de superficie. Los efectos de ARC19499 y Villar sobre el tiempo de demora se representan en las figuras 67A y B, respectivamente, mientras que los efectos de ARC19499 y Villar sobre la V_{inicial} se representan en las figuras 67C y D, respectivamente.

35 La figura 68 muestra los efectos de ARC19499 o factor VIIa recombinante (Villar), titulado en plasma de hemofilia A grave del paciente 3, sobre la formación espacial de coágulo activada con baja densidad de factor tisular de superficie. Los efectos de ARC19499 y Villar sobre el tiempo de demora se representan en las figuras 68A y B, respectivamente, mientras que los efectos de ARC19499 y Villar sobre la V_{inicial} se representan en las figuras 68C y D, respectivamente.

40 La figura 69 muestra los efectos de ARC19499 (símbolos negros) o factor VIIa recombinante (Villar; símbolos grises) sobre la $V_{\text{estacionaria}}$ en muestras de plasma de hemofilia A de los pacientes 1-3, activado con baja densidad de factor tisular de superficie.

45 La figura 70 muestra los efectos de ARC19499 (figura 70A) o factor VIIa recombinante (Villar; figura 70B) sobre el tamaño del coágulo a los 60 minutos en muestras de plasma de hemofilia A de los pacientes 1-3, activado con baja densidad de factor tisular de superficie.

50 La figura 71 es una serie de gráficos que ilustran el efecto de ARC19499 300 nM sobre el tiempo de demora promedio (figura 71A), la V_{inicial} (figura 71B), la $V_{\text{estacionaria}}$ (figura 71C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 71D) en plasma de hemofilia A activado con baja densidad de factor tisular de superficie ($n=3$). Un asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa $\pm$ ARC19499 ($P < 0,05$).

55 La figura 72 es una serie de gráficos que muestran el tiempo de demora (figura 72A), la V_{inicial} (figura 72B), la $V_{\text{estacionaria}}$ (figura 72C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 72D) en plasma de hemofilia A del paciente 4 activado con densidad media de factor tisular de superficie. Cada parámetro se representa gráficamente en función de ARC19499 (cuadrados) o factor VIIa recombinante (Villar; círculos).

60 La figura 73 es una serie de gráficos que muestran el tiempo de demora (figura 73A), la V_{inicial} (figura 73B), la $V_{\text{estacionaria}}$ (figura 73C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 73D) en plasma de hemofilia A del paciente 5 activado con densidad media de factor tisular de superficie. Cada parámetro se representa gráficamente en función de ARC19499 (cuadrados) o factor VIIa recombinante (Villar; círculos).

65 La figura 74 es una serie de gráficos que muestran el tiempo de demora (figura 74A), la V_{inicial} (figura 74B), la $V_{\text{estacionaria}}$ (figura 74C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 74D) en plasma de hemofilia A del paciente 6

activado con densidad media de factor tisular de superficie. Cada parámetro se representa gráficamente en función de ARC19499 (cuadrados) o factor VIIa recombinante (Vllar; círculos).

5 La figura 75 es una serie de gráficos que ilustran el efecto de ARC19499 300 nM sobre el tiempo de demora promedio (figura 75A), la $V_{inicial}$ (figura 75B), la $V_{estacionaria}$ (figura 75C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 75D) en plasma de hemofilia A activado con densidad media de factor tisular de superficie (n=3).

10 La figura 76 es una serie de gráficos que ilustran el tiempo de demora (figura 76A), la $V_{inicial}$ (figura 76B), la $V_{estacionaria}$ (figura 76C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 76D) en plasma normal en comparación con plasma de hemofilia A o plasma de hemofilia A que contiene ARC19499 300 nM, activado con baja densidad de factor tisular de superficie.

15 La figura 77 es un gráfico de barras que ilustra la eficacia de ARC19499 en promover la propagación de coágulos en plasma normal (barras negras) frente a plasma de hemofilia A (barras rayadas) tal como se refleja en el tiempo de demora (blanco), la $V_{inicial}$ (gris claro), la $V_{estacionaria}$ (gris medio) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (negro). La eficacia se define como la razón del parámetro determinado en presencia de ARC19499 300 nM con respecto al parámetro en ausencia de ARC19499.

20 La figura 78 ilustra la dependencia de la concentración del tiempo de demora (figura 78A) y el tamaño del coágulo a los 60 minutos (figura 78B) en ARC19499 en plasma de hemofilia A activado con baja densidad de factor tisular de superficie. Estos datos se usaron para calcular los valores de CI_{50} mostrados en la tabla debajo de los gráficos.

25 La figura 79 es una serie de gráficos que ilustran el tiempo de demora (figura 79A), la $V_{inicial}$ (figura 79B), la $V_{estacionaria}$ (figura 79C) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos (figura 79D) en plasma de hemofilia A solo en comparación con plasma de hemofilia A que contiene ARC19499 300 nM o factor VIIa recombinante (Vllar) 300 nM, activado con baja densidad de factor tisular de superficie.

30 La figura 80 compara el tiempo de demora (figura 80A) y la $V_{inicial}$ (figura 80B) en plasma empobrecido en TFPI activado con baja densidad de factor tisular de superficie. Cada gráfico muestra los parámetros medidos en plasma empobrecido en TFPI solo ("PBS"), plasma empobrecido en TFPI complementado con TFPI recombinante ± 10 nM ("TFPI"), plasma empobrecido en TFPI que contiene ARC19499 300 nM ("ARC") y plasma empobrecido en TFPI complementado con TFPI recombinante 10 nM y ARC19499 300 nM ("ARC+TFPI").

35 La figura 81 es una serie de tablas que muestran los efectos de ARC19499 sobre el ensayo del tiempo de coagulación activada por TF (TF-ACT) en muestras de sangre completa de individuos normales, con hemofilia B grave y con hemofilia A grave.

40 La figura 82 es una serie de tablas que muestran los efectos de ARC19499 sobre el ensayo del tiempo de protrombina con dilución (dPT) en muestras de plasma de individuos normales, con hemofilia B grave y con hemofilia A grave.

45 La figura 83 muestra el efecto de diferentes concentraciones de ARC19499 sobre parámetros de ROTEM en muestras de sangre completa (sin inhibidor de tripsina de maíz (CTI)) de pacientes con hemofilia (cuadrados rellenos) y controles sanos (círculos en blanco). Se analizaron los parámetros siguientes: el tiempo de coagulación (CT), el tiempo de formación de coágulo (CFT), la firmeza máxima del coágulo (MCF) y el ángulo alfa (alfa).

50 La figura 84 muestra el efecto de diferentes concentraciones de ARC19499 sobre el tiempo de coagulación (CT) en muestras de sangre de controles sanos (círculos en blanco) en comparación con pacientes con hemofilia A clasificados según el nivel de FVIII: <1 % (cuadrados rellenos), 1-5 % (triángulos rellenos, invertidos), >5 % (triángulos rellenos). La región rayada indica el intervalo en controles sanos.

55 La figura 85 muestra el efecto de diferentes concentraciones de ARC19499 sobre parámetros de ROTEM en muestras de sangre completa (con inhibidor de tripsina de maíz (CTI)) de pacientes con hemofilia (cuadrados rellenos) y controles sanos (círculos en blanco). Se analizaron los parámetros siguientes: el tiempo de coagulación (CT), el tiempo de formación de coágulo (CFT), la firmeza máxima del coágulo (MCF) y el ángulo alfa (alfa).

60 La figura 86 muestra el efecto de diferentes concentraciones de ARC19499 sobre parámetros de ROTEM en muestras de sangre completa de un solo paciente con hemofilia A adquirida. Se analizaron los parámetros siguientes: el tiempo de coagulación (CT), el tiempo de formación de coágulo (CFT), la firmeza máxima del coágulo (MCF) y el ángulo alfa (alfa).

65 La figura 87 muestra parámetros de ROTEM para sangre de control sana preincubada con un anticuerpo neutralizante frente a FVIII. Los gráficos muestran el tiempo de coagulación (CT) (panel de la izquierda) y el tiempo de formación de coágulo (CFT) (panel de la derecha) en los mismos controles; en el lado izquierdo de cada gráfico, se representan los valores tras la inhibición mediante un anticuerpo frente a FVIII.

La figura 88 muestra curvas de generación de trombina del ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT) en plasma de un paciente con hemofilia A grave representativo (panel de la izquierda) y un control sano (panel de la derecha). Ambos gráficos muestran resultados en presencia (círculos en blanco) y ausencia (cuadrados rellenos) de ARC19499 200 nM.

La figura 89 muestra representaciones gráficas de parámetros del trombograma automatizado calibrado (CAT) frente a la concentración de ARC19499, incluyendo el potencial de trombina endógeno (ETP), el tiempo hasta el pico, la concentración de trombina pico y el fin de la producción de trombina. En cada gráfico, la respuesta a ARC19499 en plasma de pacientes con hemofilia (cuadrados rellenos) se compara con controles sanos (círculos en blanco).

La figura 90 es una representación gráfica del tiempo de demora del trombograma automatizado calibrado (CAT) frente a la concentración de ARC19499, que compara la respuesta en pacientes con hemofilia (cuadrados rellenos) con controles sanos (círculos en blanco).

La figura 91 muestra el efecto de diferentes concentraciones de ARC19499 sobre la trombina pico en muestras de plasma de controles sanos (círculos en blanco) en comparación con pacientes con hemofilia A clasificados según el nivel de FVIII: <1 % (cuadrados rellenos), 1-5 % (triángulos rellenos, invertidos), >5 % (triángulos rellenos). La región rayada indica el intervalo observado en controles sanos.

La figura 92 muestra curvas de generación de trombina en plasma de un solo paciente con hemofilia A adquirida que contiene 0 nM (cuadrados rellenos), 2 nM (asteriscos), 20 nM (círculos en blanco) o 200 nM (estrellas rellenas) de ARC19499.

La figura 93 muestra parámetros del trombograma automatizado calibrado (CAT) para plasma de control sano preincubado con un anticuerpo neutralizante frente a FVIII. Los gráficos muestran el potencial de trombina endógeno (ETP) (panel de la izquierda) y la trombina pico (panel de la derecha) en los mismos controles; en el lado izquierdo de cada gráfico, se representan los valores tras la inhibición por un anticuerpo frente a FVIII.

La figura 94 muestra datos representativos del trombograma automatizado calibrado (CAT) de un voluntario sano (ARC HV 01).

La figura 95 muestra datos representativos del trombograma automatizado calibrado (CAT) de un paciente con hemofilia A grave (ARC SHA 05).

La figura 96 muestra datos representativos del trombograma automatizado calibrado (CAT) de un paciente con hemofilia A moderada (ARC MoHA 01).

La figura 97 muestra datos representativos del trombograma automatizado calibrado (CAT) de un paciente con hemofilia A leve (ARC MiHA 03).

La figura 98 es una serie de gráficos que representan la mediana de parámetros del trombograma automatizado calibrado (CAT) (potencial de trombina endógeno (ETP), trombina pico, tiempo de demora y tiempo hasta el pico) medidos en muestras de plasma recientes de pacientes con hemofilia A grave (rombos en blanco), hemofilia A moderada (cuadrados en blanco), hemofilia A leve (triángulos en blanco) o hemofilia B grave (triángulos rellenos) en comparación con controles sanos (círculos rellenos).

La figura 99 es una serie de gráficos que representan la mediana de parámetros del trombograma automatizado calibrado (CAT) (potencial de trombina endógeno (ETP), trombina pico, tiempo de demora y tiempo hasta el pico) medidos en muestras de plasma congelados/descongelados de pacientes con hemofilia A grave (rombos en blanco), hemofilia A moderada (cuadrados en blanco), hemofilia A leve (triángulos en blanco) o hemofilia B grave (triángulos rellenos) en comparación con controles sanos (círculos rellenos).

La figura 100 muestra datos representativos de tromboelastografía (TEG[®]) de sangre completa de un voluntario sano (ARC HV 01).

La figura 101 muestra datos representativos de tromboelastografía (TEG[®]) de sangre completa de un paciente con hemofilia A grave (ARC SHA 02).

La figura 102 muestra datos representativos de tromboelastografía (TEG[®]) de sangre completa de un paciente con hemofilia A moderada (ARC MoHA 01).

La figura 103 muestra datos representativos de tromboelastografía (TEG[®]) de sangre completa de un paciente con hemofilia A leve (ARC MiHA 01).

La figura 104 es una serie de gráficos que representan la mediana de parámetros de la tromboelastografía (TEG[®]) (tiempo R, K y ángulo) medidos en muestras de sangre completa de pacientes con hemofilia A grave (rombos en

blanco), hemofilia A moderada (cuadrados en blanco), hemofilia A leve (triángulos en blanco) o hemofilia B grave (triángulos rellenos) en comparación con controles sanos (círculos rellenos).

5 La figura 105 muestra datos representativos de tromboelastografía (TEG[®]) de un paciente con hemofilia A grave (ARC SHA 02).

La figura 106 muestra datos representativos de tromboelastografía (TEG[®]) de un paciente con hemofilia A moderada (ARC MoHA 01).

10 La figura 107 muestra datos representativos de tromboelastografía (TEG[®]) de un paciente con hemofilia A leve (ARC MiHA 03).

15 La figura 108 es una serie de gráficos que representan la mediana de parámetros de la tromboelastografía (TEG[®]) (tiempo R, K y ángulo) medidos en muestras de plasma de pacientes con hemofilia A grave (rombos en blanco), hemofilia A moderada (cuadrados en blanco), hemofilia A leve (triángulos en blanco) o hemofilia B grave (triángulos rellenos) en comparación con controles sanos (círculos rellenos).

20 La figura 109 es una serie de gráficos que muestran que puede invertirse la actividad de ARC19499. ARC19499 (línea discontinua) mejoró la generación de trombina en el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT) en comparación con plasma de hemofilia A solo (línea continua), tal como se mide mediante el potencial de trombina endógeno (ETP; figura 109A) y la trombina pico (figura 109B). La adición de ARC23085 (rombos rellenos), ARC23087 (triángulos en blanco), ARC23088 (cuadrados rellenos) y ARC23089 (triángulos rellenos) puede invertir esta mejora a concentraciones ≥ 100 nM, alcanzando niveles similares a en ausencia de ARC19499. En la figura 109C, los valores de R del ensayo de tromboelastografía (TEG[®]) mostraron que ARC19499 500 nM acorta el valor de R que esta prolongado en plasma de hemofilia A. ARC23085 1 μ M invirtió parcialmente esta mejora con y sin una preincubación de 5 minutos a 37 °C. ARC23087 invirtió la mejora con la adición de una preincubación de 5 minutos a 37 °C. ARC23088 mostró poca inversión en cualquier estado. ARC23089 también invirtió la mejora de ARC19499 con una preincubación de 5 minutos a 37 °C.

30 La figura 110 es una serie de curvas de generación de trombina del ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT) que muestra la actividad de ARC19499 en plasma de hemofilia A en presencia de 0,00 (figura 110A), 0,156 (figura 110B), 0,312 (figura 110C), 0,625 (figura 110D), 1,25 (figura 110E), 2,50 (figura 110F) o 5,00 UI/ml (figura 110G) de heparina de bajo peso molecular (LMWH).

35 La figura 111 es una serie de gráficos que muestran el potencial de trombina endógeno (ETP; (figura 111A) y la trombina pico (figura 111B) de ensayos de trombograma automatizado calibrado (CAT) realizados en plasma de hemofilia A con concentraciones crecientes tanto de ARC19499 como de LMWH. La concentración de LMWH se indica en el eje x en unidades de UI/ml. A dosis terapéuticas de LMWH ($\geq 1,25$ UI/ml), se invirtió la actividad procoagulante de ARC19499.

40 La figura 112 es una serie de gráficos que muestran el potencial de trombina endógeno (ETP; (figura 112A) y la trombina pico (figura 112B) de ensayos de trombograma automatizado calibrado (CAT) realizados en plasma de hemofilia A con concentraciones crecientes tanto de ARC19499 como de LMWH. La concentración de LMWH se indica en el eje x en unidades de μ M. Los datos en estos gráficos se analizaron mediante ajuste de curva para generar estimaciones de LMWH Cl_{50} en presencia de diversas concentraciones de ARC19499. Los valores de Cl_{50} pueden encontrarse en la tabla debajo de los gráficos.

45 La figura 113 es una serie de gráficos que muestran la estabilidad *in vitro* de varios aptámeros frente a TFPI en suero. Se midió la estabilidad de ARC19498 (figura 113A), ARC19499 (figura 113B), ARC19500 (figura 113C), ARC19501 (figura 113D), ARC19881 (figura 113E) y ARC19882 (figura 113F) en suero de humano, mono y rata a lo largo del transcurso de 72 horas.

50 La figura 114 es un gráfico de un ensayo de tromboelastografía (TEG[®]) donde se mezcló plasma de macacos cangrejeros que se trataron previamente con un anticuerpo anti-FVIII humano con concentraciones crecientes de ARC19499 y se sometieron a ensayo para determinar su actividad. La línea continua representa plasma de monos sin tratar y la línea discontinua representa plasma de monos tratados con anticuerpo, ambos en ausencia de aptámero. Los datos representan la media $\pm$ error estándar, representando las zonas sombreadas el error estándar de las muestras sin aptámero.

60 La figura 115 es un gráfico que muestra que independientemente del tratamiento tras la inyección de anticuerpo frente a factor VIII en macacos cangrejeros, la actividad del factor VIII disminuyó hasta <1 % y permaneció en ese valor durante la duración del estudio (5,5 horas). Los datos representan la media $\pm$ error estándar, $n=3-6$.

65 La figura 116 es una serie de gráficos que muestran los tiempos de protrombina (PT) y de tromboplastina parcial activada (aPTT) antes y después del tratamiento con ARC19499 en macacos cangrejeros.

La figura 117 es una serie de gráficos del análisis de tromboelastografía (TEG[®]) que muestra que los valores de R (figura 117A), una medida del tiempo de formación de coágulo; los ángulos (figura 117B), una medida de la velocidad de formación de coágulo; y las amplitudes máximas (MA; figura 117C), una medida de la resistencia del coágulo, determinada en monos tratados con solución salina (triángulos rellenos), NovoSeven[®] (×), ARC19499 600 µg/kg (cuadrados en blanco), ARC19499 300 µg/kg (triángulos en blanco) o ARC19499 100 µg/kg (rombos en blanco). El transcurso de tiempo del estudio se indica en el eje x. Los datos representan la media ± error estándar, n=3-6.

La figura 118 es una serie de gráficos del análisis de tromboelastografía (TEG[®]) que muestra que los valores de R (figura 118A), una medida del tiempo de formación de coágulo; los ángulos (figura 118B), una medida de la velocidad de formación de coágulo; y la amplitud máxima (MA; figura 118C), una medida de la resistencia del coágulo, se determinaron en monos adicionales tratados con NovoSeven[®] (×) o ARC19499 300 µg/kg (triángulos) durante un transcurso de tiempo mayor que en la figura 117. El transcurso de tiempo del estudio se indica en el eje x. Los datos representan la media ± error estándar, n=5 para el tratamiento con NovoSeven[®] y n=6 para el tratamiento con ARC19499.

La figura 119 es un gráfico que muestra los niveles de TFPI en macacos cangrejeros tras una dosis de ARC19499 20 mg/kg intravenosa (i.v., negro) o subcutánea (s.c., rayado) en nM en el eje y. El transcurso de tiempo se indica en el eje x. El patrón de liberación de TFPI fue muy similar para la dosificación tanto i.v. como y s.c. Los datos representan la media ± error estándar, n=3.

La figura 120 muestra el programa para la evaluación del tiempo de hemorragia y la dosificación relacionada de anticuerpo frente a FVIII y ARC19499 y la extracción de muestras de sangre en el modelo de hemorragia de primate no humano (NHP).

La figura 121 es una serie de gráficos que muestran los niveles de actividad de FVIII en muestras de plasma de diversos grupos de dosificación de macacos cangrejeros tratados con anticuerpo frente a FVIII y ARC19499: grupo 1, monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron con una dosis de ARC19499 1 mg/kg (figura 121A); grupo 2, monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg (figura 121B); grupo 3, mono cuyo tiempo de hemorragia se corrigió con tres dosis de ARC19499 1 mg/kg (figura 121C); y grupo 4, mono cuyo tiempo de hemorragia no se corrigió con tres dosis de ARC19499 1 mg/kg (figura 121D).

La figura 122 muestra tiempos de hemorragia de grupo medios para monos del grupo 1 en segundos (figura 122A) y en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial (figura 122B).

La figura 123 muestra tiempos de hemorragia individuales para monos del grupo 1 en segundos (figura 123A) y en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial (figura 123B).

La figura 124 muestra tiempos de hemorragia de grupo medios para monos del grupo 2 en segundos (figura 124A) y en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial (figura 124B).

La figura 125 muestra tiempos de hemorragia individuales para monos del grupo 2 en segundos (figura 125A) y en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial (figura 125B).

La figura 126 muestra tiempos de hemorragia para el mono del grupo 3 en segundos (figura 126A) y en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial (figura 126B).

La figura 127 muestra tiempos de hemorragia para el mono del grupo 4 en segundos (figura 127A) y en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial (figura 127B).

La figura 128 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de sangre completa de grupo medios representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para monos del grupo 1. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y el tiempo de dosificación de ARC19499 está indicado mediante un asterisco (*).

La figura 129 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de sangre completa individual representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para monos del grupo 1. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y el tiempo de dosificación de ARC19499 está indicado mediante un asterisco (*).

La figura 130 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de sangre completa de grupo medios representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para monos del grupo 2. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y los tiempos de dosificación de ARC19499 están indicados mediante asteriscos (*).

La figura 131 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de sangre completa individual representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para monos del grupo 2. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y los tiempos de dosificación de ARC19499 están indicados mediante asteriscos (*).

La figura 132 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de sangre completa individual representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para el mono del grupo 3. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y los tiempos de dosificación de ARC19499 están indicados mediante asteriscos (*).

La figura 133 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de sangre completa individual representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para el mono del grupo 4. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y los tiempos de dosificación de ARC19499 están indicados mediante asteriscos (*).

La figura 134 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de plasma de grupo medios representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para monos del grupo 1. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y el tiempo de dosificación de ARC19499 está indicado mediante un asterisco (*).

La figura 135 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de plasma individual representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para monos del grupo 1. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y el tiempo de dosificación de ARC19499 está indicado mediante un asterisco (*).

La figura 136 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de plasma de grupo medios representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para monos del grupo 2. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y los tiempos de dosificación de ARC19499 están indicados mediante asteriscos (*).

La figura 137 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de plasma individual representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para monos del grupo 2. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y los tiempos de dosificación de ARC19499 están indicados mediante asteriscos (*).

La figura 138 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de plasma individual representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para el mono del grupo 3. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y los tiempos de dosificación de ARC19499 están indicados mediante asteriscos (*).

La figura 139 es un gráfico de valores de R de tromboelastografía (TEG[®]) de plasma individual representados gráficamente frente al punto de tiempo de toma de muestras para el mono del grupo 4. El tiempo de dosificación de anticuerpo anti-factor VIII está indicado mediante un signo más (+) y los tiempos de dosificación de ARC19499 están indicados mediante asteriscos (*).

La figura 140 representa derivados de ARC17480 que contienen sustituciones en 2' individuales y múltiples en la secuencia de ARC17480. Las diferencias en relación con ARC17480 están sombreadas.

La figura 141 representa derivados de ARC17480 que contienen una sustitución de fosforotioato individual entre cada par de residuos en la secuencia de ARC17480. Cada fosforotioato está indicado mediante una "s" entre los pares de residuos en la secuencia. Las diferencias en relación con ARC17480 están sombreadas.

La figura 142A representa sustituciones en 2' toleradas y no toleradas mapeadas en la estructura secundaria probable de ARC17480. La figura 142B representa derivados de ARC17480 activos con múltiples sustituciones 2'-desoxi- a 2'-O-metil- y/o 2'-fluoro- en los cuatro residuos de desoxicitidina de ARC17480 (residuos 9, 14, 16 y 25).

La figura 143 representa derivados de ARC17480 que contienen delecciones individuales o múltiples en la secuencia de ARC17480. Las diferencias en relación con ARC17480 están resaltadas en negro.

La figura 144A representa delecciones de residuo individuales toleradas y no toleradas mapeadas en la estructura secundaria probable de ARC17480. ARC17480 comprende 2'-O-metil- (círculos) y 2'-desoxi- (cuadrados) nucleótidos y está modificada en su extremo 3'-terminal con un residuo de desoxitimidina invertida (3T). La doble delección de residuos correspondiente también se representa en los casos en que dos nucleótidos adyacentes eran idénticas. Las delecciones toleradas están resaltadas en gris y las delecciones no toleradas están resaltadas en negro. Se indican las delecciones dobles toleradas y no toleradas.

La figura 144B representa los derivados de ARC17480 activos, ARC33889 y ARC33895. Estas moléculas tienen cada una siete de los residuos de ARC17480 delecionados, que están representados por círculos negros.

La figura 145 representa los resultados de un experimento de generación de trombina con derivados de ARC19499 truncados en 3'. ARC19499, ARC21383, ARC21385, ARC21387 y ARC21389 aumentan todos ellos la generación de trombina de manera dependiente de la concentración en plasma de hemofilia A, tal como se mide mediante el potencial de trombina endógeno (ETP; figura 145A) y la trombina pico (figura 145B).

Descripción detallada de la invención

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta a continuación. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción. En la descripción, la forma singular también incluye el plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. En el caso de conflicto, regirá la presente descripción.

La invención proporciona aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se unen a TFPI, que se describen en el presente documento como "aptámeros frente a TFPI", y métodos para usar tales aptámeros en el tratamiento de trastornos hemorrágicos y otras patologías, enfermedades y trastornos mediados por TFPI, con o sin otros agentes. Además, los aptámeros frente a TFPI pueden usarse antes, durante y/o después de intervenciones médicas, con o sin otros agentes, con el fin de reducir o retardar de otro modo la progresión de las complicaciones o efectos secundarios de los mismos.

Identificación de aptámeros

Los aptámeros descritos en el presente documento se identifican preferiblemente a través de un método conocido en la técnica como Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, o SELEXTM, que se muestra en general en la figura 4. Más específicamente, partiendo de una mezcla que contiene una mezcla de partida de ácidos nucleicos, el método SELEXTM incluye las etapas de: (a) poner en contacto la mezcla con una diana en condiciones favorables para la unión; (b) separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido a la diana; (c) amplificar los ácidos nucleicos unidos para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando; y, opcionalmente, (d) repetir las etapas de poner en contacto, separar y amplificar a través de tantos ciclos como se desee para producir aptámeros de altamente específicos, de alta afinidad frente a la diana. En aquellos casos en los que estén seleccionándose aptámeros transcritos, tales como aptámeros de ARN, la etapa de amplificación del método SELEXTM incluye las etapas de: (i) someter a transcripción inversa los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-diana o transmitir de otro modo la información de secuencia a la secuencia de ADN correspondiente; (ii) realizar amplificación por PCR; y (iii) someter a transcripción los ácidos nucleicos amplificados por PCR o transmitir de otro modo la información de secuencia a la secuencia de ARN correspondiente antes de reiniciar el procedimiento. La mezcla de ácidos nucleicos de partida puede ser ADN, ARN o híbridos de ADN/ARN modificados o no modificados, y las modificaciones aceptables incluyen modificaciones en una base, azúcar y/o unión entre nucleótidos. La composición de la mezcla de partida depende de las propiedades deseadas del aptámero final. Pueden realizarse selecciones con secuencias de ácido nucleico que incorporan nucleótidos modificados, por ejemplo, para estabilizar a los aptámeros contra la degradación *in vivo*. Por ejemplo, puede aumentarse enormemente la resistencia a la degradación por nucleasas mediante la incorporación de grupos de modificación en la posición 2'.

En una realización, la invención proporciona aptámeros que incluyen sustituciones en 2' individuales en todas las bases o combinaciones de modificaciones con 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-NH₂ y 2'-OMe de los nucleótidos adenosina trifosfato (ATP), guanosina trifosfato (GTP), citidina trifosfato (CTP), timidina trifosfato (TTP) y uridina trifosfato (UTP). En otra realización, la invención proporciona aptámeros que incluyen combinaciones de modificaciones con 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH₂ y 2'-metoxietilo de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y UTP. En una realización adicional, la invención proporciona aptámeros que incluyen todos o sustancialmente todos los nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP y/o UTP modificados con 2'-OMe.

En algunas realizaciones, los aptámeros modificados en 2' de la invención se crean usando polimerasas modificadas, por ejemplo, una ARN polimerasa modificada que tiene una velocidad de incorporación de nucleótidos modificados que tienen sustituyentes voluminosos en la posición 2' de furanosa que es mayor que la de las polimerasas de tipo natural. En una realización, la ARN polimerasa modificada es una polimerasa de T7 mutante en la que la tirosina en la posición 639 se ha cambiado a fenilalanina (Y639F). En otra realización, la ARN polimerasa modificada es una polimerasa de T7 mutante en la que la tirosina en la posición 639 se ha cambiado a fenilalanina y la lisina en la posición 378 se ha cambiado a arginina (Y639F/K378R). Aún en otra realización, la ARN polimerasa modificada es una polimerasa de T7 mutante en la que la tirosina en la posición 639 se ha cambiado a fenilalanina,

la histidina en la posición 784 se ha cambiado a una alanina, y la lisina en la posición 378 se ha cambiado a arginina (Y639F/H784A/K378R), y la mezcla de reacción de transcripción requiere una adición conocida de 2'-OH-GTP para la transcripción. En una realización adicional, la ARN polimerasa modificada es una polimerasa de T7 mutante en la que la tirosina en la posición 639 se ha cambiado a fenilalanina y la histidina en la posición 784 se ha cambiado a una alanina (Y639F/H784A).

En una realización, la ARN polimerasa modificada es una polimerasa de T7 mutante en la que la tirosina en la posición 639 se ha cambiado a leucina (Y639L). En otra realización, la ARN polimerasa modificada es una polimerasa de T7 mutante en la que la tirosina en la posición 639 se ha cambiado a leucina y la histidina en la posición 784 se ha cambiado a una alanina (Y639L/H784A). Aún en otra realización, la ARN polimerasa modificada es una polimerasa de T7 mutante en la que la tirosina en la posición 639 se ha cambiado a leucina, la histidina en la posición 784 se ha cambiado a alanina, y la lisina en la posición 378 se ha cambiado a arginina (Y639L/H784A/K378R).

Otra ARN polimerasa adecuada que tiene una velocidad de incorporación de nucleótidos modificados que tiene sustituyentes voluminosos en la posición 2' de furanosa que es mayor que la de las polimerasas de tipo natural es, por ejemplo, una ARN polimerasa de T3 mutante. En una realización, la ARN polimerasa de T3 mutante tiene una mutación en la posición 640, en la que la tirosina en la posición 640 se reemplaza con una fenilalanina (Y640F). En otra realización, la ARN polimerasa de T3 mutante tiene mutaciones en las posiciones 640 y 785, en las que la tirosina en la posición 640 se reemplaza con una leucina y la histidina en la posición 785 se reemplaza con una alanina (Y640L/H785A).

Los oligonucleótidos modificados en 2' pueden sintetizarse completamente de nucleótidos modificados o con un subconjunto de nucleótidos modificados. Las modificaciones pueden ser iguales o diferentes. Algunos o todos los nucleótidos pueden modificarse, y los que se modifican pueden contener la misma modificación. Por ejemplo, todos los nucleótidos que contienen la misma base pueden tener un tipo de modificación, mientras que los nucleótidos que contienen otras bases pueden tener tipos diferentes de modificación. Todos los nucleótidos de purina pueden tener un tipo de modificación (o están sin modificar), mientras que todos los nucleótidos de pirimidina tienen otro tipo de modificación diferente (o están sin modificar). De este modo, se generan transcritos, o mezclas de transcritos, usando cualquier combinación de modificaciones, incluyendo, por ejemplo, ribonucleótidos (2'-OH), desoxirribonucleótidos (2'-desoxi), 2'-amino-nucleótidos (2'-NH₂), 2'-fluoro-nucleótidos (2'-F) y 2'-O-metil- (2'-OMe) nucleótidos.

Tal como se usa en el presente documento, una mezcla de transcripción que contiene solo trifosfatos de 2'-OMe-A, G, C y U y/o T (2'-OMe-ATP, 2'-OMe-UTP y/o 2'-OMe-TTP, 2'-OMe-CTP y 2'-OMe-GTP) se denomina una mezcla de MNA o mRmY, y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de MNA o aptámeros de mRmY y contienen solo 2'-O-metil-nucleótidos. Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-C y U y/o T, y 2'-OH-A y G se denomina una mezcla de "rRmY", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "rRmY". Una mezcla de transcripción que contiene desoxi-A y G, y 2'-OMe-U y/o T y C se denomina una mezcla de "dRmY", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "dRmY". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, C y U y/o T, y 2'-OH-G se denomina una mezcla de "rGmH", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "rGmH". Una mezcla de transcripción que contiene alternativamente 2'-OMe-A, C, U y/o T y G, y 2'-OMe-A, U y/o T, y C, y 2'-F-G se denomina una "mezcla alternante", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "mezcla alternante". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OH-A y G, y 2'-F-C y U y/o T se denomina una mezcla de "rRfY", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "rRfY". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A y G, y 2'-F-C y U y/o T se denomina una mezcla de "mRfY", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "mRfY". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, U y/o T, y C, y 2'-F-G se denomina una mezcla de "fGmH", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "fGmH". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, U y/o T, C y G, donde hasta el 10 % de las G son ribonucleótidos se denomina una mezcla de "r/mGmH", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "r/mGmH". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, U y/o T, y C, y desoxi-G se denomina una mezcla de "dGmH", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "dGmH". Una mezcla de transcripción que contiene desoxi-A, y 2'-OMe-C, G y U y/o T se denomina una mezcla de "dAmB", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "dAmB". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OH-A, y 2'-OMe-C, G y U y/o T se denomina una mezcla de "rAmB", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "rAmB". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OH-A y 2'-OH-G, y 2'-desoxi-C y 2'-desoxi-T se denomina una mezcla de "rRdY", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "rRdY". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, U y/o T, y G, y desoxi-C se denomina una mezcla de "dCmD", y los aptámeros seleccionados de ella se denominan aptámeros de "dCmD". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, G y C, y desoxi-T se denomina una mezcla de "dTmV", y los aptámeros seleccionados de ella se denominan aptámeros de "dTmV". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, C y G, y 2'-OH-U se denomina una mezcla de "rUmV", y los aptámeros seleccionados de ella se denominan aptámeros de "rUmV". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-OMe-A, C y G, y 2'-desoxi-U se denomina una mezcla de "dUmV", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "dUmV". Una mezcla de transcripción que contiene todos los 2'-OH-nucleótidos se denomina una mezcla de "rN", y los aptámeros

seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "rN", "rRy" o ARN. Una mezcla de transcripción que contiene todos los desoxinucleótidos se denomina una mezcla de "dN", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "dN", "dRy" o ADN. Una mezcla de transcripción que contiene 2'-F-C y 2'-OMe-A, G y U y/o T se denomina una mezcla de "fCmD", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "fCmD". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-F-U y 2'-OMe-A, G y C se denomina una mezcla de "fUmV", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "fUmV". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-F-A y G, y 2'-OMe-C y U y/o T se denomina una mezcla de "fRmY", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "fRmY". Una mezcla de transcripción que contiene 2'-F-A y 2'-OMe-C, G y U y/o T se denomina una mezcla de "fAmB", y los aptámeros seleccionados de la misma se denominan aptámeros de "fAmB".

Se han determinado varios factores que son útiles para optimizar las condiciones de transcripción usadas para producir los aptámeros divulgados en el presente documento. Por ejemplo, puede incorporarse una secuencia líder en la secuencia fijada en el extremo 5' de un molde de transcripción de ADN. La secuencia líder tiene normalmente 6-15 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos de longitud, y puede estar compuesta toda por purinas, o por una mezcla de nucleótidos de purina y pirimidina.

Para las composiciones que contienen 2'-OMe-GTP, otro factor útil puede ser la presencia o la concentración de 2'-OH-guanosina o guanosina monofosfato (GMP). La transcripción puede dividirse en dos fases: la primera fase es la iniciación, durante la cual el ARN se extiende aproximadamente 10-12 nucleótidos; la segunda fase es la elongación, durante la cual la transcripción avanza más allá de la adición de los primeros aproximadamente 10-12 nucleótidos. Se ha encontrado que 2'-OH-GMP o guanosina añadido a una mezcla de transcripción que contiene un exceso de 2'-OMe-GTP es suficiente para permitir que la polimerasa inicie la transcripción. La transcripción con cebador con 2'-OH-guanosina, por ejemplo, o GMP es útil debido a la especificidad de la polimerasa para el nucleótido de inicio. La concentración preferida de GMP es de 0,5 mM e incluso más preferiblemente 1 mM.

Otro factor útil para optimizar la incorporación de nucleótidos sustituidos con 2'-OMe en transcritos es el uso de tanto magnesio y manganeso divalentes en la mezcla de transcripción. Se han encontrado que diferentes combinaciones de concentraciones de cloruro de magnesio y cloruro de manganeso afectan a los rendimientos de transcritos modificados en 2'-O, dependiendo de la concentración óptima de cloruro de magnesio y de manganeso de la concentración de NTP en la mezcla de reacción de transcripción que complejan iones metálicos divalentes.

Otros reactivos que pueden incluirse en la reacción de transcripción incluyen tampones tales como tampón ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES), un reactivo redox tal como ditiotreitól (DTT), un polication tal como espermidina, espermina, un tensioactivo tal como Triton X100, y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, la concentración de tampón HEPES puede oscilar entre 0 y 1 M. La invención también contempla el uso de otros agentes tamponantes que tienen un pKa de entre 5 y 10, incluyendo, por ejemplo, Tris-hidroximetil-aminometano. En algunas realizaciones, la concentración de DTT puede oscilar entre 0 y 400 mM. Los métodos de la invención también proporcionan el uso de otros agentes reductores, incluyendo, por ejemplo, mercaptoetanol. En algunas realizaciones, la concentración de espermidina y/o espermina puede oscilar entre 0 y 20 mM. En algunas realizaciones, la concentración de PEG-8000 puede oscilar entre el 0 y el 50 % (p/v). Los métodos de la invención también proporcionan el uso de otros polímeros hidrófilos, incluyendo, por ejemplo, PEG de otro peso molecular PEG u otros polialquilenglicoles. En algunas realizaciones, la concentración de Triton X-100 puede oscilar entre el 0 y el 0,1 % (p/v). Los métodos de la invención también proporcionan el uso de otros detergentes no iónicos, incluyendo, por ejemplo, otros detergentes, incluyendo otros detergentes Triton-X. En algunas realizaciones, la concentración de MgCl₂ puede oscilar entre 0,5 mM y 50 mM. La concentración de MnCl₂ puede oscilar entre 0,15 mM y 15 mM. En algunas realizaciones, la concentración de 2'-OMe-NTP (cada NTP) puede oscilar entre 5 μM y 5 mM. En algunas realizaciones, la concentración de 2'-OH-GTP puede oscilar entre 0 μM y 300 μM. En algunas realizaciones, la concentración de 2'-OH-GMP puede oscilar entre 0 y 5 mM. El pH puede oscilar entre pH 6 y pH 9.

También pueden usarse variaciones del procedimiento SELEX para identificar aptámeros. Por ejemplo, puede usarse SELEX con agonista, SELEX de alternancia, SELEX con modificación en 2' o contra-SELEX. Cada una de estas variaciones del procedimiento SELEX se conoce en la técnica.

Aptámeros frente a TFPI

La invención incluye aptámeros de ácido nucleico, tal como se define en las reivindicaciones, preferiblemente de 20-55 nucleótidos de longitud, que se unen al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y que, en algunas realizaciones, modulan funcionalmente, por ejemplo, estimulan, bloquean o inhiben o estimulan de otro modo, la actividad de TFPI.

Los aptámeros frente a TFPI se unen al menos en parte a TFPI o una variante o una o más partes (o regiones) del mismo. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de

aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica.

Una variante de TFPI, tal como se usa en el presente documento, engloba variantes que realizan esencialmente la misma función que las funciones de TFPI, preferiblemente incluye sustancialmente la misma estructura y en algunas realizaciones incluye al menos una identidad de secuencia del 70 %, preferiblemente al menos una identidad de secuencia del 80 %, más preferiblemente al menos una identidad de secuencia del 90 %, y más preferiblemente al menos una identidad de secuencia del 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % con la secuencia de aminoácidos de TFPI humano, que se muestra en la figura 5 como SEQ ID NO: 11.

Preferiblemente, los aptámeros frente a TFPI se unen un TFPI de longitud completa. Si un aptámero se une a una o más partes de TFPI, es preferible que el aptámero requiera contactos de unión u otra interacción con una parte de TFPI, al menos en parte, fuera de las regiones K1 y K2, tal como la región K3/C-terminal. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Más preferiblemente, los aptámeros frente a TFPI se unen al menos en parte a una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) que se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175, aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270, aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195, aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276.

El TFPI puede proceder de cualquier especie, pero es preferiblemente humano.

Los aptámeros frente a TFPI comprenden preferiblemente una constante de disociación para TFPI humano, o una variante del mismo, de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, preferiblemente 50 nM o menos, preferiblemente 25 nM o menos, preferiblemente 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, incluso más preferiblemente 1 nM o menos, y lo más preferiblemente 500 pM o menos. En algunas realizaciones, la constante de disociación se determina por titulación de transferencia puntual.

Los aptámeros frente a TFPI pueden ser ácido ribonucleico, ácido desoxirribonucleico, ácidos nucleicos modificados (por ejemplo, modificados en 2') o ácido ribonucleico, ácido desoxirribonucleico y ácidos nucleicos modificados mixtos, o cualquier combinación de los mismos. Los aptámeros pueden ser ácido nucleico monocatenario, ácido desoxirribonucleico, ácidos nucleicos modificados (por ejemplo, modificados en 2'), ácido ribonucleico y ácido nucleico modificado, ácido desoxirribonucleico y ácido nucleico modificado, o ácido ribonucleico, ácido desoxirribonucleico y ácidos nucleicos modificados mixtos, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, los aptámeros frente a TFPI comprenden al menos una modificación química. En algunas realizaciones, la modificación química se selecciona del grupo que consiste en: una sustitución química en una posición de azúcar, una sustitución química en una unión entre nucleótidos y una sustitución química en una posición de base. En otras realizaciones, la modificación química se selecciona del grupo que consiste en: incorporación de un nucleótido modificado; una caperuza en 3'; una caperuza en 5'; conjugación con un compuesto no inmunogénico de alto peso molecular; conjugación con un compuesto lipófilo; incorporación de un motivo CpG; e incorporación de un fosforotioato o fosforoditioato en la estructura principal de fosfato. En una realización preferida, el compuesto no inmunogénico de alto peso molecular es polialquilenglicol, y más preferiblemente es polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, el polietilenglicol es metoxipolietilenglicol (mPEG). En otra realización preferida, la caperuza en 3' es una caperuza de desoxitimidina invertida.

Las modificaciones descritas en el presente documento pueden afectar a la estabilidad del aptámero, por ejemplo, la incorporación de un resto de caperuza puede estabilizar al aptámero contra la degradación por endonucleasa. Adicionalmente, las modificaciones descritas en el presente documento pueden afectar a la afinidad de unión de un aptámero por su diana, por ejemplo, la incorporación específica de sitio de un nucleótido modificado o la conjugación

con un PEG puede afectar a la afinidad de unión. El efecto de tales modificaciones sobre la afinidad de unión puede determinarse usando una variedad de técnicas reconocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, ensayos funcionales, tales como un ELISA, o ensayos de unión en los que se incubaba un aptámero traza marcado con diversas concentraciones de diana y se capturan los complejos en nitrocelulosa y se cuantifican, para comparar las afinidades de unión antes y después de la incorporación de una modificación.

Preferiblemente, los aptámeros frente a TFPI se unen al menos en parte a TFPI o una variante o una o más partes del mismo y actúan como antagonista para inhibir la función de TFPI.

Los aptámeros frente a TFPI inhiben, reducen, bloquean o modulan de otro modo completa o parcialmente la inhibición mediada por TFPI de la coagulación sanguínea. Se considera que los aptámeros frente a TFPI modulan, bloquean, inhiben, reduce, antagonizan, neutralizan o interfieren de otro modo completamente con la actividad biológica de TFPI, tal como la inhibición mediada por TFPI de la coagulación sanguínea, cuando el nivel de inhibición mediada por TFPI en presencia del aptámero frente a TFPI disminuye en al menos el 95 %, por ejemplo, en el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % en comparación con el nivel de inhibición mediada por TFPI en ausencia del aptámero frente a TFPI. Se considera que los aptámeros frente a TFPI modulan, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o interfieren de otro modo parcialmente con la actividad biológica de TFPI, tal como inhibición mediada por TFPI, cuando el nivel de inhibición mediada por TFPI en presencia del aptámero frente a TFPI disminuye en menos del 95 %, por ejemplo, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 % o el 90 % en comparación con el nivel de actividad de TFPI en ausencia del aptámero frente a TFPI.

Los ejemplos de aptámeros que se unen a y modulan la función de TFPI para su uso como agentes terapéuticos y/o agentes de diagnóstico incluyen, pero no se limitan a, ARC26835, ARC17480, ARC19498, ARC19499, ARC19500, ARC19501, ARC31301, ARC18546, ARC19881 y ARC19882.

Preferiblemente, los aptámeros frente a TFPI comprenden una de las siguientes secuencias de ácido nucleico:

(ARC26835)

mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mUmG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA (SEQ ID NO: 1), en la que "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo (que también se conoce en la técnica como un nucleótido que contienen 2'-OMe, 2'-metoxi o 2'-OCH₃); y

(ARC17480)

mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mUmG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 2), en la que "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo; y

(ARC19498)

NH₂-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mGmU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 3), en la que "NH₂" procede de una fosforamidita con ligador de 5'-hexilamina, "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo; y

(ARC19499)

PEG40K-NH-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mAmG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 4), en la que "NH" procede de una fosforamidita con ligador de 5'-hexilamina, "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido, "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo y "PEG" es un polietilenglicol; y

(ARC19500)

NH₂-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mGmU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-NH₂ (SEQ ID NO: 5), en la que "dN" es un desoxinucleótido, "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo y "NH₂" procede de una fosforamidita con ligador de hexilamina; y

(ARC19501)

PEG20K-NH-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mAmG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-NH-PEG20K (SEQ ID NO: 6), en la que "dN" es un desoxinucleótido, "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo, "NH" procede de una fosforamidita con ligador de hexilamina y "PEG" es un polietilenglicol; y

(ARC31301)

mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mUmG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA (SEQ ID NO: 7), en la que “dN” es un desoxinucleótido y “mN” es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo; y

(ARC18546)

mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mUmG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 8), en la que "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo; y

(ARC19881)

NH₂-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mGmU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 9), en la que "NH₂" procede de una fosforamidita con ligador de 5'-hexilamina, "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo; y

(ARC19882)

PEG40K-NH-mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mG-mU-mU-mAmG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 10), en la que “NH” procede de una fosoramidita con ligador de 5'-hexilamina, “3T” es una desoxitimidina invertida, “dN” es un desoxinucleótido, “mN” es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo y “PEG” es un polietilenglicol.

El nombre químico de ARC26835 es 2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenililil.

El nombre químico de ARC17480 es 2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-(3'→3')-2'-desoxitimidina.

El nombre químico de ARC19498 es 6-aminohexilil-(1→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-(3'→3')-2'-desoxitimidina.

El nombre químico de ARC19499 es N-(metoxi-polietilenglicol)-6-aminohexilil-(1→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-desoxitimidina.

El nombre químico de ARC19500 es 6-aminohexilil-(1'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-

guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-6-aminohexililo.

- 5 El nombre químico de ARC19501 es N-(metoxi-polietilenglicol)-6-aminohexilil-(1→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-6-aminohexilil-N-(metoxi-polietilenglicol).

- 15 El nombre químico de ARC31301 es 2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenililo.

- 25 El nombre químico de ARC18546 es 2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxitimidina.

- 30 El nombre químico de ARC19881 es 6-aminohexilil-(1→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxitimidina.

- 40 El nombre químico de ARC19882 es N-(metoxi-polietilenglicol)-6-aminohexilil-(1→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-desoxicitidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-desoxitimidina.

- 50 Los aptámeros frente a TFPI de la invención pueden tener cualquier estructura secundaria. Preferiblemente, los aptámeros frente a TFPI comprenden un motivo de tallo y bucle, tal como en las figuras 10A y B. La estructura secundaria probable de ARC19499 se representa en la figura 10C, que comprende un motivo de tallo y bucle.

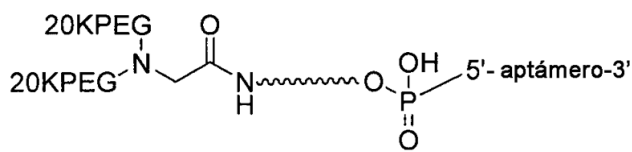
- Preferiblemente, los aptámeros frente a TFPI se conectan a uno o más restos PEG, con (figura 10B) o sin (figura 10A) uno o más ligadores. Los restos PEG pueden ser cualquier tipo de resto PEG. Por ejemplo, el resto PEG puede ser lineal, ramificado, ramificado múltiple, en forma de estrella, en forma de peine o un dendrímero. Además, el resto PEG puede tener cualquier peso molecular. Preferiblemente, el resto PEG tiene un peso molecular que oscila entre 5-100 kDa de tamaño. Más preferiblemente, el resto PEG tiene un peso molecular que oscila entre 10-80 kDa de tamaño. Incluso más preferiblemente, el resto PEG tiene un peso molecular que oscila entre 20-60 kDa de tamaño. Aún incluso más preferiblemente, el resto PEG tiene un peso molecular que oscila entre 30-50 kDa de tamaño. Lo más preferiblemente, el resto PEG tiene un peso molecular de 40 kDa de tamaño. Pueden conectarse restos PEG iguales o diferentes a un aptámero frente a TFPI. Pueden usarse ligadores iguales o diferentes o no usarse ligadores para conectar restos PEG iguales o diferentes a un aptámero frente a TFPI.

- 65 Alternativamente, los aptámeros frente a TFPI pueden conectarse a una o más alternativas de PEG (en lugar de a uno o más restos PEG), con o sin uno o más ligadores. Los ejemplos de alternativas de PEG incluyen, pero no se limitan a, polioxazolina (POZ), poliPEG, hidroxietilalmidón (HES) y albúmina. La alternativa de PEG puede ser

cualquier tipo de alternativa de PEG, pero debe funcionar igual que o similar al resto PEG, es decir, reducir la filtración renal y aumentar la semivida del aptámero frente a TFPI en la circulación. Pueden conectarse alternativas de PEG iguales o diferentes a un aptámero frente a TFPI. Pueden usarse ligadores iguales o diferentes o no usarse ligadores para conectar alternativas de PEG iguales o diferentes a un aptámero frente a TFPI. Alternativamente, puede conectarse una combinación de restos PEG y alternativas de PEG a un aptámero frente a TFPI, con o sin uno o más ligadores iguales o diferentes.

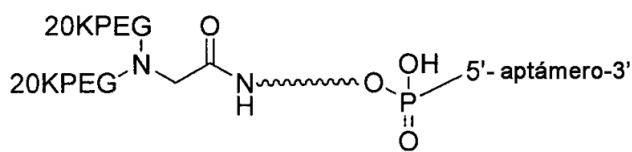
Preferiblemente, los aptámeros frente a TFPI se conectan a un resto PEG a través de un ligador (figura 10B). Sin embargo, los aptámeros frente a TFPI pueden conectarse a un resto PEG directamente, sin el uso de un ligador (figura 10A). El ligador puede ser cualquier tipo de molécula. Los ejemplos de ligadores incluyen, pero no se limitan a, aminas, tioles y azidas. Por ejemplo, pueden usarse aminas (RNH_2) y ésteres activados ($\text{R}'\text{C}(=\text{O})\text{OR}''$) o anhídridos ($\text{R}'\text{C}(=\text{O})\text{OC}(=\text{O})\text{R}''$) como ligadores para producir una amida ($\text{R}'\text{C}(=\text{O})\text{NR}$). Los ésteres activados incluyen, sin limitación, ésteres de NHS (N-hidroxisuccinimida) y sulfoderivados de NHS, nitrofenilo y otros derivados aromáticos sustituidos. Los anhídridos pueden ser cíclicos, tales como derivados de anhídrido de ácido succínico. Pueden usarse aminas (RNH_2) y carbonatos activados ($\text{R}'\text{OC}(=\text{O})\text{OR}''$) para producir carbamatos ($\text{ROC}(=\text{O})\text{NR}$). Los carbamatos activados incluyen, sin limitación, carbamatos de NHS (N-hidroxisuccinimida) y sulfoderivados de NHS, nitrofenilo. Pueden usarse aminas (RNH_2) e isotiocianatos ($\text{R}'\text{N}=\text{C}=\text{S}$) como ligadores para producir isotioureas ($\text{RNHC}(=\text{S})\text{NHR}'$). Pueden usarse aminas (RNH_2) e isocianatos ($\text{R}'\text{N}=\text{C}=\text{O}$) como ligadores para producir isoureas ($\text{RNH}(\text{C}=\text{O})\text{NHR}'$). Pueden usarse aminas (RNH_2) y azidas de acilo ($\text{R}'\text{C}(=\text{O})\text{N}_2$) como ligadores para producir amidas ($\text{RNH}(\text{C}=\text{O})\text{R}'$). Pueden usarse aminas (RNH_2) y aldehídos o glioxales ($\text{R}'\text{C}(=\text{O})\text{H}$) como ligadores para producir iminas ($\text{R}'\text{CH}=\text{NR}$) o aminas a través de reducción ($\text{R}'\text{CH}_2=\text{NHR}$). Pueden usarse aminas (RNH_2) y cloruros de sulfonilo ($\text{R}'\text{SO}_2\text{Cl}$) como ligadores para producir sulfoamidas ($\text{R}'\text{SO}_2\text{NHR}$). Pueden usarse aminas (RNH_2) y epóxidos y oxiranos como ligadores para dar α -hidroxiaminas. Pueden usarse tioles (RSH) y yodoacetilos ($\text{R}'\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{I}$) como ligadores para producir tioéteres ($\text{RSCH}_2(\text{O}=\text{C})\text{R}'$). Pueden usarse tioles (RSH) y maleimidas o derivados de maleimida como ligadores para dar tioéteres. Pueden usarse tioles (RSH) y aziridinas como ligadores para dar tioéteres de α -amina. Pueden usarse tioles (RSH) y derivados de acrilóilo ($\text{R}'\text{CH}=\text{CH}_2$) como ligadores para dar tioéteres ($\text{R}'\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SR}$). Pueden usarse tioles (RSH) y disulfuros ($\text{R}'\text{SSR}''$) como ligadores para dar disulfuros (RSSR' o R''). Pueden usarse tioles (RSH) y vinilsulfonas ($\text{CH}_2=\text{CHSO}_2\text{R}'$) como ligadores para producir tiol éteres ($\text{RSCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{R}'$). Pueden usarse azidas (RN_3) y alquinos ($\text{R}'\text{C}\equiv\text{H}$) como ligadores para producir triazolininas. Preferiblemente, el ligador contiene un grupo fosfato. Preferiblemente, el ligador procede de una fosforamidita con ligador de 5'-amina. En algunas realizaciones, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 2-18 grupos CH_2 consecutivos. En realizaciones más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 2-12 grupos CH_2 consecutivos. En realizaciones incluso más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 4-8 grupos CH_2 consecutivos. En las realizaciones más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 6 grupos CH_2 consecutivos, es decir, es una fosforamidita con ligador de 5'-hexilamina. Pueden usarse uno o más de los ligadores iguales o diferentes o no usarse ligadores para conectar uno o más de los restos PEG iguales o diferentes o una o más de las alternativas de PEG iguales o diferentes a un aptámero frente a TFPI.

En realizaciones preferidas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



en la que $\text{HN}-\text{wavy line}-\text{PO}_3\text{H}$ procede de una fosforamidita con ligador de 5'-amina, y el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

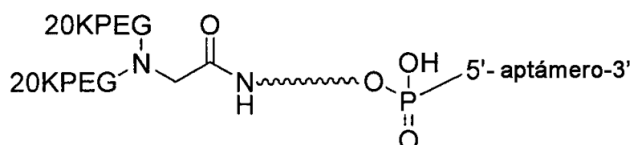
En una particular realización, el aptámero, o una sal del mismo, comprende la estructura siguiente:



en la que $\text{HN}-\text{wavy line}-\text{PO}_3\text{H}$ procede de una fosforamidita con ligador de 5'-amina, y el aptámero tiene la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mGmU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 2), en la que "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. En algunas realizaciones, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 2-18 grupos CH_2 consecutivos. En realizaciones más preferidas, la fosforamidita con

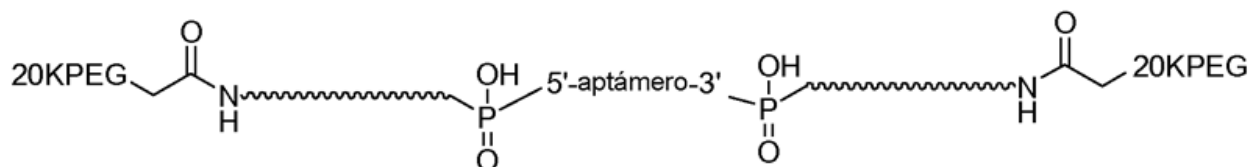
ligador de 5'-amina comprende 2-12 grupos CH₂ consecutivos. En realizaciones incluso más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 4-8 grupos CH₂ consecutivos. En las realizaciones más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 6 grupos CH₂ consecutivos. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En una particular realización, el aptámero, o una sal del mismo, comprende la estructura siguiente:



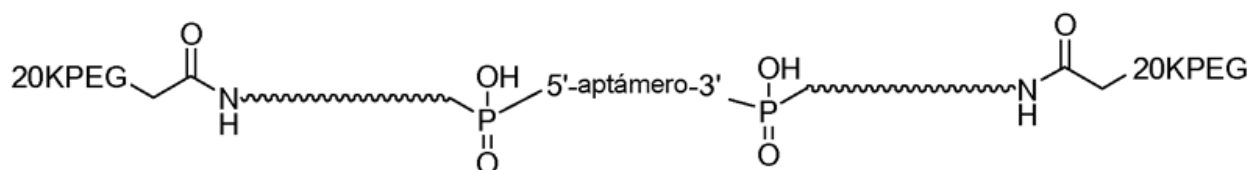
en la que HN ~~~~~ PO₃H procede de una fosforamidita con ligador de 5'-amina, y el aptámero tiene la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mU-dC-mGmU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 8), en la que "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. En algunas realizaciones, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 2-18 grupos CH₂ consecutivos. En realizaciones incluso más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 2-12 grupos CH₂ consecutivos. En las realizaciones incluso más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 4-8 grupos CH₂ consecutivos. En las realizaciones más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 6 grupos CH₂ consecutivos. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En realizaciones preferidas alternativas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



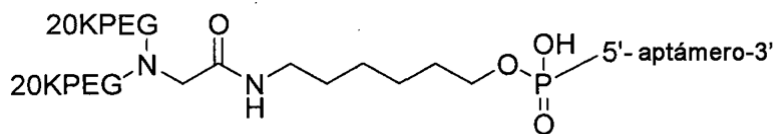
en la que HN ~~~~~ PO₂H procede de una fosforamidita con ligador de 5'-amina, y el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En una realización alternativa particular, el aptámero, o una sal del mismo, comprende la estructura siguiente:



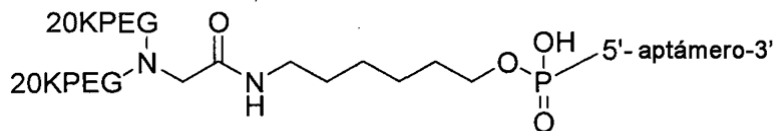
en la que HN ~~~~~ PO₂H procede de una fosforamidita con ligador de 5'-amina, y el aptámero tiene la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-dC-mGmU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA (SEQ ID NO: 1), en la que "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. En algunas realizaciones, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 2-18 grupos CH₂ consecutivos. En realizaciones más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 2-12 grupos CH₂ consecutivos. En realizaciones incluso más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 4-8 grupos CH₂ consecutivos. En las realizaciones más preferidas, la fosforamidita con ligador de 5'-amina comprende 6 grupos CH₂ consecutivos. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En realizaciones más preferidas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



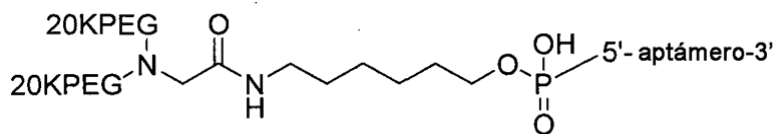
en la que el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En una particular realización, el aptámero, o una sal del mismo, comprende la estructura siguiente:



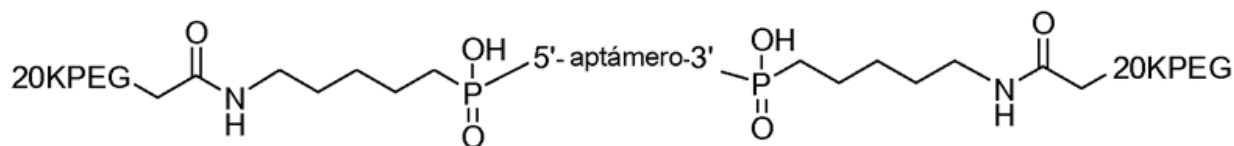
en la que el aptámero tiene la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mUdC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ NO: 2), en la que "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En una particular realización, el aptámero, o una sal del mismo, comprende la estructura siguiente:



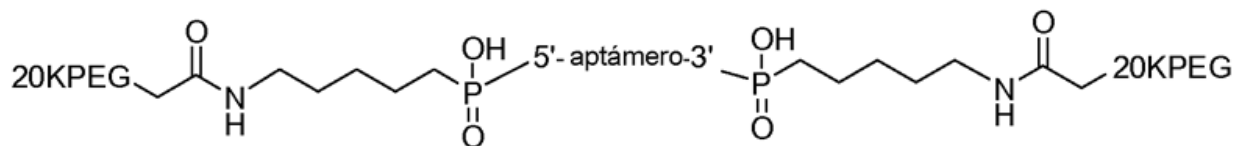
en la que el aptámero tiene la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mUdC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 8), en la que "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En realizaciones más preferidas alternativas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



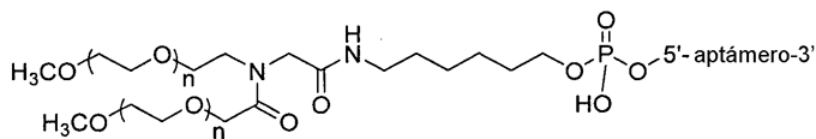
en la que el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En una realización alternativa particular, el aptámero, o una sal del mismo, comprende la estructura siguiente:



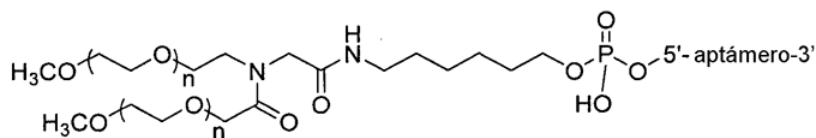
en la que el aptámero tiene la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mUdC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA (SEQ ID NO: 1), en la que "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. El resto 20KPEG puede ser cualquier resto PEG que tenga un peso molecular de 20 kDa. Preferiblemente, el resto 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.

En las realizaciones más preferidas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



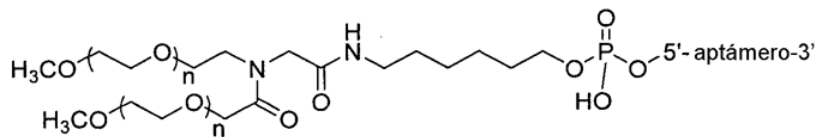
en la que "n" es aproximadamente 454 unidades de óxido de etileno (PEG = 20 kDa), y el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. "n" es aproximadamente 454 unidades de óxido de etileno porque el número de n puede variar ligeramente para un PEG que tiene un peso molecular particular. Preferiblemente, "n" oscila entre 400-500 unidades de óxido de etileno. Más preferiblemente, "n" oscila entre 425-475 unidades de óxido de etileno. Incluso más preferiblemente, "n" oscila entre 440-460 unidades de óxido de etileno. Lo más preferiblemente, "n" es 454 unidades de óxido de etileno.

En una particular realización, el aptámero, o una sal del mismo, comprende la estructura siguiente:



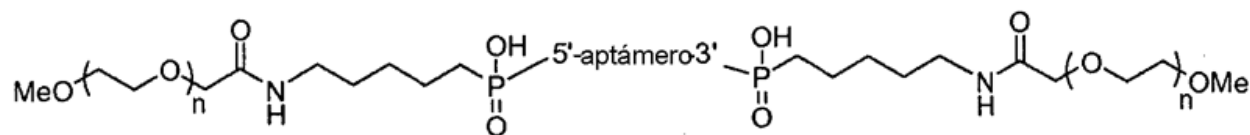
en la que el aptámero tiene la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mUdC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ NO: 2), en la que "n" es aproximadamente 450, "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. Este aptámero también se conoce como ARC19499.

En una particular realización, el aptámero, o una sal del mismo, comprende la estructura siguiente:



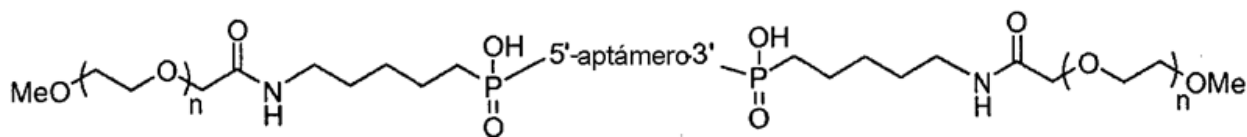
en la que el aptámero tiene la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-mC-mUdC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-mC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ NO: 8), en la que "n" es aproximadamente 450, "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. Este aptámero también se conoce como ARC19882.

En las realizaciones más preferidas alternativas, se proporciona un aptámero, o una sal del mismo, que comprende la estructura siguiente:



en la que "n" es aproximadamente 454 unidades de óxido de etileno (PEG = 20 kDa), y el aptámero es un aptámero frente a TFPI de la invención. "n" es aproximadamente 454 unidades de óxido de etileno porque el número de n puede variar ligeramente para un PEG que tiene un peso molecular particular. Preferiblemente, "n" oscila entre 400-500 unidades de óxido de etileno. Más preferiblemente, "n" oscila entre 425-475 unidades de óxido de etileno. Incluso más preferiblemente, "n" oscila entre 440-460 unidades de óxido de etileno. Lo más preferiblemente, "n" es 454 unidades de óxido de etileno.

En una realización alternativa particular, el aptámero, o una sal del mismo, comprende la estructura siguiente:



en la que el aptámero tiene la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mUdC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA (SEQ ID NO: 1), en la que “n” es aproximadamente 450, “dN” es un desoxinucleótido y “mN” es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo. Este aptámero también se conoce como ARC19501.

La invención también proporciona aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, los aptámeros tienen sustancialmente la misma estructura que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, los aptámeros tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI y sustancialmente la misma estructura que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. La invención también proporciona aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI y sustancialmente la misma capacidad para modular una función biológica de TFPI que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. La invención proporciona además aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI y sustancialmente la misma capacidad para modular la coagulación sanguínea que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. La invención también proporciona aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que tienen sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad para modular una función biológica de TFPI que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. La invención también proporciona aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que tienen sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad para modular la coagulación sanguínea que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, los aptámeros tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI, sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad para modular una función biológica de TFPI que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, los aptámeros tienen sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI, sustancialmente la misma estructura y sustancialmente la misma capacidad para modular la coagulación sanguínea que cualquiera de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Tal como se usa en el presente documento, sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI significa que la afinidad está dentro de uno o dos órdenes de magnitud de la afinidad de las secuencias de ácido nucleico y/o aptámeros descritas en el presente documento. Está completamente dentro de la experiencia de los expertos habituales en la técnica determinar si una secuencia dada tiene sustancialmente la misma capacidad para unirse a TFPI. En algunas realizaciones, el aptámero que se une a TFPI tiene una secuencia de ácido nucleico idéntica en al menos el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 95 % a SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

La capacidad de un aptámero para unirse a TFPI puede evaluarse en un ensayo de competencia de unión, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 34, en el que uno de los aptámeros mostrado en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 puede seleccionarse como competidor que actúa como aptámero de control. Por ejemplo, un ensayo adecuado puede implicar incubar TFPI humano 10 nM (American Diagnostica, Stamford, CT, n.º de catálogo 4500PC) con cantidades traza de aptámero de control radiomarcado y 5000 nM, 16667 nM, 556 nM, 185 nM, 61,7 nM, 20,6 nM, 6,86 nM, 2,29 nM, 0,76 nM o 0,25 nM de un aptámero competidor no marcado. Se incluye un aptámero de control en cada experimento. Para cada molécula, se usa el porcentaje de aptámero de control radiomarcado unido a cada concentración de aptámero competidor para el análisis. Se representa gráficamente el porcentaje de aptámero de control radiomarcado unido en función de la concentración de aptámero y se ajusta a la ecuación $y = (\text{máx}/(1 + x/CI_{50})) + \text{int}$, donde y = el porcentaje de aptámero de control radiomarcado unido, x = la concentración de aptámero, máx = el aptámero de control radiomarcado unido máximo, e int = la ordenada en el origen, para generar un valor de CI_{50} para competencia de unión. La CI_{50} de cada aptámero se compara con la CI_{50} del aptámero de control evaluado en el mismo experimento. Un aptámero que tiene sustancialmente la misma capacidad para unirse puede incluir un aptámero que tiene una CI_{50} que está dentro de uno o dos órdenes de magnitud de la CI_{50} del aptámero de control, y/o un aptámero que tiene una CI_{50} que no es más de 5 veces mayor que la del aptámero de control evaluado en el mismo experimento.

La capacidad de un aptámero para modular una función biológica y/o para modular la coagulación sanguínea puede evaluarse en un ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT), por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 34, en el que uno de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 puede seleccionarse como aptámero de control. Por ejemplo, un ensayo adecuado puede implicar la evaluación en un ensayo de CAT en plasma de hemofilia A mezclado a una concentración de aptámero de 500 nM, 167 nM, 55,6 nM, 18,5 nM, 6,17 nM y 2,08 nM. Se incluye un aptámero de control en cada experimento. Para cada molécula, se usan los valores de potencial de trombina endógeno (ETP) y trombina pico a cada concentración de aptámero para el análisis. El valor de ETP o trombina pico para plasma de hemofilia A solo se resta del valor correspondiente en presencia de aptámero para cada molécula a cada concentración. Entonces, se representan gráficamente los

valores pico y de ETP corregidos en función de la concentración de aptámero y se ajustan a la ecuación $y = (\text{máx}/(1 + \text{Cl}_{50}/x)) + \text{int}$, donde y = ETP o trombina pico, x = concentración de aptámero, máx = el ETP máximo o trombina pico, e int = la ordenada en el origen, para generar un valor de Cl_{50} tanto para ETP como para la trombina pico. La Cl_{50} de cada aptámero se compara con la Cl_{50} del aptámero de control que se evalúa en el mismo experimento. Un aptámero que tiene sustancialmente la misma capacidad para modular una función biológica y/o para modular la coagulación sanguínea puede incluir un aptámero que tiene una Cl_{50} que está dentro de uno o dos órdenes de magnitud de la Cl_{50} del aptámero de control, y/o un aptámero para el que uno o ambos del ETP y la Cl_{50} de la trombina pico de esa molécula son no más de 5 veces mayor que los del aptámero de control evaluado en el mismo experimento.

La capacidad de un aptámero para modular una función biológica y/o para modular la coagulación sanguínea puede evaluarse valorando la inhibición de TFPI en un ensayo de actividad del factor Xa (FXa), por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 34, en el que uno de los aptámeros mostrados en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 puede seleccionarse como aptámero de control. Un ensayo adecuado puede implicar medir la capacidad de FXa para escindir un sustrato cromogénico en presencia y ausencia de TFPI, con o sin la adición de aptámero. Por ejemplo, se incubaba FXa humano 2 nM con TFPI humano 8 nM. Entonces, se añaden sustrato cromogénico y aptámeros 500 μM y se mide la escisión por FXa del sustrato mediante absorbancia a 405 nm (A_{405}) en función del tiempo. Se someten a prueba los aptámeros a concentraciones de 500 nM, 125 nM, 31,25 nM, 7,81 nM, 1,95 nM y 0,49 nM. Se incluye un aptámero de control en cada experimento. Para cada concentración de aptámero, se representa gráficamente la A_{405} en función del tiempo y se ajusta la región lineal de cada curva a la ecuación $y = mx + b$, donde $y = A_{405}$, x = la concentración de aptámero, m = la velocidad de escisión de sustrato, y b = la ordenada en el origen, para generar una velocidad de escisión de sustrato por FXa. La velocidad de escisión de sustrato por FXa en presencia de TFPI y en ausencia de aptámero se resta del valor correspondiente en presencia tanto de TFPI como de aptámero para cada molécula a cada concentración. Entonces, se representan gráficamente las velocidades corregidas en función de la concentración de aptámero y se ajustan a la ecuación $y = (V_{\text{máx}}/(1 + \text{Cl}_{50}/x))$, donde y = la velocidad de escisión de sustrato, x = concentración de aptámero, y $V_{\text{máx}}$ = la velocidad máxima de escisión de sustrato, para generar un valor de Cl_{50} y máximo ($V_{\text{máx}}$). Los valores de Cl_{50} y $V_{\text{máx}}$ de cada aptámero se comparan con los valores de Cl_{50} y $V_{\text{máx}}$ del aptámero de control evaluado en el mismo experimento. Un aptámero que tiene sustancialmente la misma capacidad para modular una función biológica y/o para modular la coagulación sanguínea puede incluir un aptámero que tiene una Cl_{50} que está dentro de uno o dos órdenes de magnitud de la Cl_{50} del aptámero de control, y/o un aptámero que tiene una Cl_{50} que no es más de 5 veces mayor que la del aptámero de control evaluado en el mismo experimento, y/o un aptámero que tiene un valor de $V_{\text{máx}}$ de no menos del 80 % del valor de $V_{\text{máx}}$ del aptámero de control evaluado en el mismo experimento.

Los términos “identidad de secuencia” o “% de identidad”, en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o proteína, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para determinar la correspondencia máxima, tal como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. La alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981); mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970); mediante búsqueda por un método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988); mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.); o mediante inspección visual (véase en general, Ausubel, F. M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987)).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la identidad de secuencia en porcentaje es el algoritmo usado en la herramienta de búsqueda de alineación local (a continuación en el presente documento “BLAST”), véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990) y Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 15: 3389-3402 (1997), que está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (a continuación en el presente documento “NCBI”).

Los aptámeros de la invención incluyendo, pero sin limitarse a, aptámeros identificados por el método SELEX™, SELEX™ modificado en 2', aptámeros minimizados, aptámeros optimizados y aptámeros sustituidos químicamente, pueden fabricarse usando cualquier técnica de síntesis de oligonucleótidos que se conoce bien en la técnica, tal como técnicas de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida (véase, por ejemplo, Gualtiere, F. Ed., *New Trends in Synthetic Medicinal Chemistry*, capítulo 9, *Chemistry of Antisense Oligonucleotides*, págs. 261-335, 2000, Wiley-VCH, Nueva York). La fabricación de aptámeros usando técnicas de síntesis de oligonucleótido en fase sólida también puede realizarse a escala comercial. Los métodos en fase de disolución, tales como métodos de síntesis de triéster (véase, por ejemplo, Sood *et al.*, *Nucl. Acid Res.* 4:2557 (1977) e Hirose *et al.*, *Tet. Lett.*, 28:2449 (1978)), pueden usarse para fabricar aptámeros de la invención, así como medios recombinantes.

Además, puede introducirse una variedad de grupos funcionales durante la síntesis en fase sólida. La funcionalidad puede ser un único ligador que da como resultado un grupo funcional, tal como una amina o tiol, o puede ser un

constructo más complejo, tal como una biotina o un colorante fluorescente. Normalmente, se introducen ligadores con grupos funcionales o restos más complejos usando una fosforamidita, o pueden introducirse tras la síntesis (es decir, tras la síntesis en fase sólida). Alternativamente, utilizando un soporte sólido modificado, pueden introducirse una variedad de funcionalidades en el extremo 3' del oligonucleótido, permitiendo de ese modo una variedad más amplia de técnicas de conjugación.

La invención proporciona además aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se han identificado mediante el procedimiento SELEX™, que comprende las etapas de (a) poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos con TFPI en condiciones en las que se produce la unión; (b) separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido a TFPI; (c) amplificar los ácidos nucleicos unidos para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando; y, opcionalmente, (d) repetir las etapas de unir, separar y amplificar a través de tantos ciclos como se desee para obtener aptámero(s) que se une(n) a TFPI.

La invención proporciona además métodos para identificar aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes de TFPI, que comprenden las etapas de (a) poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos con una o más partes de TFPI en condiciones en las que se produce la unión; (b) separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido a TFPI; (c) amplificar los ácidos nucleicos unidos para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando; y, opcionalmente, (d) repetir las etapas de poner en contacto, separar y amplificar a través de tantos ciclos como se desee, para obtener aptámero(s) que se une(n) a una parte de TFPI. Este método también puede incluir ciclos intermedios o adicionales con unión a TFPI de longitud completa, seguido por separación y amplificación. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Preferiblemente, la una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175, aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270, aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195, aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276. El aptámero comprende preferiblemente una constante de disociación para TFPI humano o una variante o una o más partes del mismo, de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, preferiblemente 50 nM o menos, preferiblemente 25 nM o menos, preferiblemente 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, incluso más preferiblemente 1 nM o menos, y lo más preferiblemente 500 pM o menos.

La invención también proporciona métodos para identificar aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes de TFPI, que comprenden las etapas de (a) poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos con TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI en condiciones en las que se produce la unión; (b) separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido a TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI; (c) eluir específicamente los ácidos nucleicos unidos con TFPI de longitud completa o una parte de TFPI, o un ligando que se une a TFPI de longitud completa o una parte de TFPI; (d) amplificar los ácidos nucleicos unidos para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando; y, opcionalmente, (e) repetir las etapas de poner en contacto, separar, eluir y amplificar a través de tantos ciclos como se desee para obtener aptámero(s) que se une(n) a una o más partes de TFPI. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Preferiblemente, la una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175, aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270,

aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195, aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276. El aptámero comprende preferiblemente una constante de disociación para TFPI humano o una variante o una o más partes del mismo de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, preferiblemente 50 nM o menos, preferiblemente 25 nM o menos, preferiblemente 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, incluso más preferiblemente 1 nM o menos, y lo más preferiblemente 500 pM o menos.

La invención proporciona además métodos para identificar aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes de TFPI, que comprenden las etapas de (a) poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos con TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI en condiciones en las que se produce la unión en presencia de un ligando de TFPI (un ligando que se une a TFPI) que bloquea que uno o más epítomos en TFPI se unan al aptámero; (b) separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido a TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI; (c) amplificar los ácidos nucleicos unidos para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando; y, opcionalmente, (d) repetir las etapas de poner en contacto, separar y amplificar a través de tantos ciclos como se desee para obtener aptámero(s) que se une(n) a una o más partes de TFPI. En otras realizaciones de este método, puede producirse la inclusión de un ligando de TFPI que bloquea que una o más partes en TFPI se unan al aptámero durante la etapa de puesta en contacto, la etapa de separación, o ambas. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Preferiblemente, la una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175, aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270, aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195, aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276. El aptámero comprende preferiblemente una constante de disociación para TFPI humano o una variante o una o más partes del mismo de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, preferiblemente 50 nM o menos, preferiblemente 25 nM o menos, preferiblemente 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, incluso más preferiblemente 1 nM o menos, y lo más preferiblemente 500 pM o menos.

La invención proporciona además métodos para identificar aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes de TFPI, que comprenden las etapas de (a) poner en contacto una mezcla de ácidos nucleicos con TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI en condiciones en las que se produce la unión; (b) separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido a TFPI de longitud completa o una o más partes de TFPI; (c) separar los ácidos nucleicos unidos que tienen una propiedad funcional deseada de los ácidos nucleicos unidos que no tienen una propiedad funcional deseada; (d) amplificar los ácidos nucleicos unidos que tienen una propiedad funcional deseada para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando; y, opcionalmente, (e) repetir las etapas de poner en contacto, separar, eluir y amplificar a través de tantos ciclos como se desee para obtener aptámero(s) que se une(n) a una o más partes de TFPI. Las etapas (b) y (c) pueden producirse secuencial o simultáneamente. Por ejemplo, los aptámeros frente a TFPI pueden unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un aptámero frente a TFPI se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando el aptámero se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Preferiblemente, la una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175,

aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270, aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195, aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276. El aptámero comprende preferiblemente una constante de disociación para TFPI humano o una variante o una o más partes del mismo de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, preferiblemente 50 nM o menos, preferiblemente 25 nM o menos, preferiblemente 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, incluso más preferiblemente 1 nM o menos, y lo más preferiblemente 500 pM o menos.

La invención también proporciona un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une a un polipéptido de inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en el que el aptámero modula la inhibición mediada por TFPI de la coagulación sanguínea, y en la que el aptámero compete por unirse a TFPI con un aptámero de referencia que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 4 (ARC19499), SEQ ID NO: 1 (ARC26835), SEQ ID NO: 2 (ARC17480), SEQ ID NO: 3 (ARC19498), SEQ ID NO: 5 (ARC19500), SEQ ID NO: 6 (ARC19501), SEQ ID NO: 7 (ARC31301), SEQ ID NO: 8 (ARC18546), SEQ ID NO: 9 (ARC19881) y SEQ ID NO: 10 (ARC19882). Preferiblemente, el aptámero de referencia comprende la secuencia de ácido nucleico de (SEQ ID NO: 4 (ARC19499)).

La invención proporciona además un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une a un polipéptido de inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en la que el aptámero se une a una parte lineal o una parte conformacional de TFPI en la que al menos una parte de la región reconocida por el aptámero es diferente de la región de TFPI a la que se une el factor VIIa, el factor Xa, o tanto el factor VIIa como el factor Xa. Preferiblemente, el aptámero se une a una o más regiones que comprenden al menos una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 seleccionada del grupo que consiste en: los residuos de aminoácido 148-170, residuos de aminoácido 150-170, residuos de aminoácido 155-175, residuos de aminoácido 160-180, residuos de aminoácido 165-185, residuos de aminoácido 170-190, residuos de aminoácido 175-195, residuos de aminoácido 180-200, residuos de aminoácido 185-205, residuos de aminoácido 190-210, residuos de aminoácido 195-215, residuos de aminoácido 200-220, residuos de aminoácido 205-225, residuos de aminoácido 210-230, residuos de aminoácido 215-235, residuos de aminoácido 220-240, residuos de aminoácido 225-245, residuos de aminoácido 230-250, residuos de aminoácido 235-255, residuos de aminoácido 240-260, residuos de aminoácido 245-265, residuos de aminoácido 250-270, residuos de aminoácido 255-275, residuos de aminoácido 260-276, residuos de aminoácido 148-175, residuos de aminoácido 150-175, residuos de aminoácido 150-180, residuos de aminoácido 150-185, residuos de aminoácido 150-190, residuos de aminoácido 150-195, residuos de aminoácido 150-200, residuos de aminoácido 150-205, residuos de aminoácido 150-210, residuos de aminoácido 150-215, residuos de aminoácido 150-220, residuos de aminoácido 150-225, residuos de aminoácido 150-230, residuos de aminoácido 150-235, residuos de aminoácido 150-240, residuos de aminoácido 150-245, residuos de aminoácido 150-250, residuos de aminoácido 150-255, residuos de aminoácido 150-260, residuos de aminoácido 150-265, residuos de aminoácido 150-270, residuos de aminoácido 150-275, residuos de aminoácido 150-276, residuos de aminoácido 190-240, residuos de aminoácido 190-276, residuos de aminoácido 240-276, residuos de aminoácido 242-276, residuos de aminoácido 161-181, residuos de aminoácido 162-181, residuos de aminoácido 182-240, residuos de aminoácido 182-241 y residuos de aminoácido 182-276. Más preferiblemente, el aptámero compete con un aptámero de referencia que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 (ARC19499) para unirse a TFPI.

La invención también proporciona un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une a la misma región en polipéptido de inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 como la región a la que se une un aptámero frente a TFPI que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 (ARC19499).

La invención proporciona además un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une a una región en un polipéptido de inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano que comprende una o más partes de (SEQ ID NO: 11, en el que la una o más partes se selecciona del grupo que consiste en: los residuos de aminoácido 148-170, residuos de aminoácido 150-170, residuos de aminoácido 155-175, residuos de aminoácido 160-180, residuos de aminoácido 165-185, residuos de aminoácido 170-190, residuos de aminoácido 175-195, residuos de aminoácido 180-200, residuos de aminoácido 185-205, residuos de aminoácido 190-210, residuos de aminoácido 195-215, residuos de aminoácido 200-220, residuos de aminoácido 205-225, residuos de aminoácido 210-230, residuos de aminoácido 215-235, residuos de aminoácido 220-240, residuos de aminoácido 225-245, residuos de aminoácido 230-250, residuos de aminoácido 235-255, residuos de aminoácido 240-260, residuos de aminoácido 245-265,

residuos de aminoácido 250-270, residuos de aminoácido 255-275, residuos de aminoácido 260-276, residuos de aminoácido 148-175, residuos de aminoácido 150-175, residuos de aminoácido 150-180, residuos de aminoácido 150-185, residuos de aminoácido 150-190, residuos de aminoácido 150-195, residuos de aminoácido 150-200, residuos de aminoácido 150-205, residuos de aminoácido 150-210, residuos de aminoácido 150-215, residuos de aminoácido 150-220, residuos de aminoácido 150-225, residuos de aminoácido 150-230, residuos de aminoácido 150-235, residuos de aminoácido 150-240, residuos de aminoácido 150-245, residuos de aminoácido 150-250, residuos de aminoácido 150-255, residuos de aminoácido 150-260, residuos de aminoácido 150-265, residuos de aminoácido 150-270, residuos de aminoácido 150-275, residuos de aminoácido 150-276, residuos de aminoácido 190-240, residuos de aminoácido 190-276, residuos de aminoácido 240-276, residuos de aminoácido 242-276, residuos de aminoácido 161-181, residuos de aminoácido 162-181, residuos de aminoácido 182-240, residuos de aminoácido 182-241 y residuos de aminoácido 182-276.

La invención proporciona adicionalmente un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano y muestra una o más de las siguientes propiedades: a) compite por unirse a TFPI con una cualquiera de SEQ ID NO: 1-10; b) inhibe la inhibición de TFPI del factor Xa; c) aumenta la generación de trombina en plasma de hemofilia; d) inhibe la inhibición de TFPI del complejo tenasa intrínseco; e) restablece la hemostasia normal, tal como se mide mediante tromboelastografía (TEG[®]) en sangre completa y plasma; f) restablece la coagulación normal, tal como se indica mediante un tiempo de formación de coágulo más corto, formación de coágulo más rápida o desarrollo de coágulo más estable, tal como se mide mediante tromboelastografía (TEG[®]) o tromboelastometría rotacional (ROTEM) en sangre completa y plasma; o g) disminuye el tiempo de formación de coágulo, tal como se mide mediante tiempo de protrombina con dilución (dPT), tiempo de coagulación activada por factor tisular (TF-ACT) o cualquier otra medición del tiempo de formación de coágulo sensible a TFPI.

La invención también proporciona un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une al inhibidor de la vía del factor tisular humano en la que el aptámero compite por unirse a TFPI con un aptámero de referencia seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

La invención proporciona además un aptámero que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) en la que el aptámero compite directamente por unirse a TFPI con un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: AD4903.

La invención también proporciona un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano y comprende un motivo de tallo y bucle que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, en el que: a) uno cualquiera o más de los nucleótidos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 13, 17, 20, 21, 22, 24, 28, 30 y 32 puede estar modificado de una sustitución 2'-OMe a una sustitución 2'-desoxi; b) uno cualquiera o más de los nucleótidos 5, 7, 15, 19, 23, 27, 29 y 31 puede estar modificado de un 2'-OMe-uracilo a o bien un 2'-desoxi-uracilo o bien una 2'-desoxi-timina; c) el nucleótido 18 puede estar modificado de un 2'-OMe-uracilo a un 2'-desoxi-uracilo; y/o d) uno cualquiera o más de los nucleótidos 14, 16 y 25 puede estar modificado de una 2'-desoxi-citosina a o bien una 2'-OMe-citosina o bien una 2'-fluoro-citosina.

La invención proporciona adicionalmente un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano y comprende los nucleótidos 7-28 de SEQ ID NO: 2.

La divulgación proporciona además un método para tratar un trastorno hemorrágico que comprende administrar uno cualquiera de los aptámeros anteriores.

La invención proporciona además un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), en el que el aptámero comprende una secuencia primaria de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Una secuencia primaria de ácido nucleico de un aptámero se refiere únicamente a los nucleótidos (adenina, guanina, citosina, uracilo, timina), sin ninguna modificación (tal como una modificación de 2'-O-metilo, 2'-fluoro, 3T o PEG).

Química médica de aptámeros

Una vez identificados los aptámeros que se unen a TFPI, pueden realizarse opcionalmente varias técnicas con el fin de aumentar adicionalmente la unión, la estabilidad, la potencia y/o las características funcionales de las secuencias de aptámero identificadas.

Los aptámeros que se unen a TFPI pueden truncarse con el fin de obtener la secuencia de aptámero mínima que tiene las características de unión y/o funcionales deseadas (también denominado en el presente documento un "constructo minimizado" o un "aptámero minimizado"). Un método para llevar esto a cabo es mediante el uso de programas de plegamiento y análisis de secuencia, por ejemplo, alineando secuencias de clones que resultan de una selección para buscar motivos conservados y/o covariación para informar del diseño de constructos minimizados. Los programas de plegamiento adecuados incluyen, por ejemplo, el programa de estructura de ARN

(Mathews, D.H.; Disney, M.D.; Childs, J.L.; Schroeder, S.J.; Zuker, M.; y Turner, D.H., "Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure," 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences, US, 101, 7287-7292). También pueden realizarse experimentos de sondas bioquímicas con el fin de determinar los límites en 5' y 3' de una secuencia de aptámero para informar del diseño de constructos minimizados. Entonces pueden sintetizarse químicamente constructos minimizados y someterse a prueba para determinar las características de unión y funcionales, en comparación con la secuencia no minimizada de la que se derivan. También pueden sintetizarse químicamente de manera directa variantes de una secuencia de aptámero que contiene una serie de deleciones en 5', 3' y/o internas y someterse a prueba para determinar las características de unión y/o funcionales, en comparación con la secuencia de aptámero no minimizada de la que se derivan.

Adicionalmente, pueden usarse nuevas selecciones dopadas para explorar los requisitos de secuencia dentro de una secuencia de aptámero activa individual o una secuencia de aptámero minimizada individual. Se realizan nuevas selecciones dopadas usando una mezcla degenerada sintética que se ha diseñado basándose en la secuencia individual de interés. El nivel de degeneración varía habitualmente del 70 % al 85 % con respecto a la secuencia de tipo natural, es decir, la secuencia individual de interés. En general, se identifican secuencias con mutaciones neutras a través del procedimiento de nueva selección dopada, pero en algunos casos los cambios de secuencia pueden dar como resultado mejoras en la afinidad. Entonces puede usarse la información de secuencia compuesta de clones identificados usando nuevas selecciones dopadas para identificar el motivo de unión mínimo y para ayudar en los esfuerzos de optimización.

También pueden optimizarse secuencias de aptámero y/o secuencias de aptámero minimizadas tras SELEX™ usando química médica de aptámeros para realizar mutagénesis al azar o dirigida de la secuencia para aumentar la afinidad de unión y/o las características funcionales, o alternativamente para determinar qué posiciones en la secuencia son esenciales para la actividad de unión y/o las características funcionales.

La química médica de aptámeros es una técnica de mejora de aptámeros en la que se sintetizan químicamente conjuntos de aptámeros variantes. Estos conjuntos de variantes difieren normalmente del aptámero original por la introducción de un sustituyente individual, y difieren entre sí por la ubicación de este sustituyente. Entonces se comparan estas variantes entre sí y con el original. Las mejoras en las características pueden ser lo suficientemente profundas como para que la inclusión de un sustituyente individual pueda ser todo lo que se necesita para lograr un criterio terapéutico particular.

Alternativamente, la información obtenida a partir del conjunto de variantes individuales puede usarse para diseñar conjuntos adicionales de variantes en los que se introduce simultáneamente más de un sustituyente. En una estrategia de diseño, se clasifican todas las variantes de sustituyente individual, se eligen las 4 mejores y se sintetizan y se someten a ensayo todas las posibles combinaciones dobles (6), triples (4) y cuádruples (1) de estas 4 variantes de sustituyente individual. En una segunda estrategia de diseño, se considera que la mejor variante de sustituyente individual es el nuevo compuesto original y se sintetizan y se someten a ensayo todas las posibles variantes de sustituyente doble que incluyen esta variante de sustituyente individual mejor clasificada. Pueden usarse otras estrategias, y estas estrategias pueden aplicarse repetidamente de manera que el número de sustituyentes aumente gradualmente a la vez que se continúa identificando variantes mejoradas adicionalmente.

La química médica de aptámeros puede usarse particularmente como método para explorar la introducción local, en lugar de la global, de sustituyentes. Puesto que los aptámeros se descubren dentro de bibliotecas que se generan mediante transcripción, cualquier sustituyente que se introduce durante el procedimiento SELEX™ puede introducirse globalmente. Por ejemplo, si se desea introducir uniones fosforotioato entre los nucleótidos, solo pueden introducirse en cada A (o en cada G, C, T, U, etc.) si se sustituyen globalmente. Los aptámeros que requieren fosforotioatos en algunas A (o en algunas G, C, T, U, etc.) (sustituidas localmente) pero no pueden tolerarlo en otras A (o en algunas G, C, T, U, etc.) no pueden descubrirse fácilmente mediante este procedimiento.

Los tipos de sustituyentes que pueden utilizarse mediante el procedimiento de la química médica de aptámeros solo están limitados por la capacidad para introducirlos en un esquema de síntesis de oligómeros. Desde luego, el procedimiento no se limita a los nucleótidos solos. Los esquemas de química médica de aptámeros pueden incluir sustituyentes que introducen impedimento estérico, hidrofobicidad, hidrofilicidad, lipofilicidad, lipofobicidad, carga positiva, carga negativa, carga neutra, zwitteriones, polarizabilidad, resistencia a nucleasas, rigidez conformacional, flexibilidad conformacional, características de unión a proteínas, masa, etc. Los esquemas de química médica de aptámeros pueden incluir modificaciones de base, modificaciones de azúcar o modificaciones de unión fosfodiéster.

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

(1) sustituyentes ya presentes en el organismo, por ejemplo, 2'-desoxi-, 2'-ribo-, 2'-O-metil-nucleótidos, inosina o 5-metil-citosina;

(2) sustituyentes que ya forman parte de un agente terapéutico aprobado, por ejemplo, 2'-fluoro-nucleótidos; o

(3) sustituyentes que se hidrolizan, degradan o metabolizan para dar una de las dos categorías anteriores, por ejemplo, oligonucleótidos unidos a metilfosfonato u oligonucleótidos unidos a fosforotioato.

Los aptámeros de la invención incluyen aptámeros desarrollados a través de química médica de aptámeros, tal como se describe en el presente documento.

La afinidad de unión a la diana de los aptámeros de la invención puede evaluarse a través de una serie de reacciones de unión entre el aptámero y la diana (por ejemplo, una proteína) en las que se incubaba un aptámero marcado con ^{32}P traza con series de dilución de la diana en un medio tamponado y luego se analiza mediante filtración en nitrocelulosa usando un colector de filtración a vacío. Denominado en el presente documento el ensayo de unión de transferencia puntual, este método usa un medio de filtración de tres capas que consiste en (de arriba abajo) nitrocelulosa, filtro de nailon y papel secante. El aptámero que está unido a la diana se captura sobre el filtro de nitrocelulosa, mientras que el aptámero no unido a la diana se captura sobre el filtro de nailon. El papel secante se incluye como un medio de soporte para los otros filtros. Tras la filtración, las capas de filtro se separan, se secan y se exponen sobre una pantalla de fósforo y se cuantifican usando un sistema de detección y cuantificación de la reactividad. Los resultados cuantificados pueden usarse para generar curvas de unión de aptámeros a partir de las que pueden calcularse las constantes de disociación (K_D). En una realización preferida, el medio tamponado usado para realizar las reacciones de unión es 1x PBS de Dulbecco (con Ca^{++} y Mg^{++}) más BSA 0,1 mg/ml.

Generalmente, la capacidad de un aptámero para modular la actividad funcional de una diana puede evaluarse usando modelos *in vitro* e *in vivo*, que variarán dependiendo de la función biológica de la diana. En algunas realizaciones, los aptámeros de la invención pueden inhibir una función biológica conocida de la diana. En otras realizaciones, los aptámeros de la invención pueden estimular una función biológica conocida de la diana. La actividad funcional de los aptámeros de la invención puede evaluarse usando modelos *in vitro* e *in vivo* diseñados para medir una función conocida de TFPI.

Las secuencias de aptámero y/o secuencias de aptámero minimizadas también pueden optimizarse usando química médica de aptámeros dirigida al perfil metabólico para la identificación específica de sitio de sitios de escisión y modificaciones para optimizar la estabilidad de las secuencias de aptámero y/o secuencias de aptámero minimizadas.

La química médica de aptámeros dirigida al perfil metabólico implica la incubación de un aptámero original con un fluido de prueba para dar como resultado una mezcla. Entonces, se analiza la mezcla para determinar la velocidad de desaparición del aptámero original o la cantidad o el porcentaje de aptámero que permanece tras la incubación, el perfil metabólico del aptámero específico y las secuencias de metabolito del aptámero específico. El conocimiento de las secuencias de los metabolitos específicos formados permite que se identifiquen los sitios de escisión de nucleasas basándose en la masa del/de los metabolito(s). Tras realizar sistemáticamente la obtención del perfil metabólico e identificar los sitios de escisión del aptámero específicos, el método implica introducir sustituciones o modificaciones químicas en o cerca de los sitios de escisión que están diseñados para optimizar la estabilidad de las secuencias de aptámero y/o las secuencias de aptámero minimizadas.

En una realización, un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, se identifica y se modifica a) incubando un aptámero original con un fluido de prueba para dar como resultado una mezcla; b) analizando la mezcla para identificar metabolitos del aptámero original, detectando de ese modo al menos un sitio de escisión de aptámero en el aptámero original; y c) introduciendo una sustitución química en una posición proximal a al menos un sitio de escisión de aptámero para dar como resultado un aptámero modificado. Esto potencia la estabilidad del aptámero, y, en particular, la estabilidad del aptámero frente a endonucleasas y exonucleasas.

En algunas realizaciones, el fluido de prueba es una matriz biológica, particularmente una matriz biológica seleccionada del grupo que consiste en uno o más de: suero; plasma; líquido cefalorraquídeo; extractos tisulares, incluyendo fracción citosólica, fracción S9 y fracción microsómica; humor acuoso; humor vítreo y homogeneizados tisulares. En algunas realizaciones, la matriz biológica se deriva de una especie seleccionada del grupo que consiste en una o más de: ratón, rata, mono, cerdo, humano, perro, cobaya y conejo. En algunas realizaciones, el fluido de prueba comprende al menos una enzima purificada, particularmente al menos una enzima purificada seleccionada del grupo que consiste en: fosfodiesterasa de veneno de serpiente y ADNasa I.

En algunas realizaciones, la etapa de análisis incluye analizar el aptámero resultante usando cromatografía de líquidos y espectrometría de masas, particularmente cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de ionización por electrospray, electroforesis en gel de poliacrilamida o electroforesis capilar para determinar una posición de al menos un sitio de escisión de aptámero. En algunas realizaciones, la etapa de análisis incluye analizar el aptámero resultante usando un método bioanalítico seleccionado del grupo que consiste en uno o más de: electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) desnaturalizante; electroforesis capilar; cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL/EM), particularmente CL/EM/EM o CL/EM/EM/EM, y más particularmente CL/EM de ionización por electrospray (ESI-CL/EM), ESI-

CL/EM/EM y ESI-CL/EM/EM/EM.

En algunas realizaciones, la posición proximal incluye una posición seleccionada del grupo que consiste en: una posición inmediatamente en 5' con respecto al sitio de escisión del aptámero, una posición en 5' en o dentro de tres nucleótidos del sitio de escisión de aptámero, una posición inmediatamente en 3' con respecto al sitio de escisión de aptámero, una posición en 3' en o dentro de tres nucleótidos del sitio de escisión de aptámero, y en la unión entre nucleótidos escindida.

En algunas realizaciones, la sustitución química se selecciona del grupo que consiste en: una sustitución química en una posición de azúcar; una sustitución química en una posición de base y una sustitución química en una unión entre nucleótidos. Más particularmente, una sustitución se selecciona del grupo que consiste en: un nucleótido sustituido por un nucleótido diferente; una sustitución de purina por una pirimidina; una sustitución de 2'-amina por cualquier nucleótido; una sustitución de 2'-desoxi-dihidouridina por una uridina; una 2'-desoxi-5-metil-citidina por una citidina; una sustitución de 2-amino-purina por una purina; un fosforotioato sustituido por un fosfodiéster; un fosforoditioato sustituido por un fosfodiéster; un 2'-desoxi-nucleótido sustituido por un 2'-OH-nucleótido, un 2'-OMe-nucleótido o un 2'-fluoro-nucleótido; un 2'-OMe-nucleótido sustituido por un 2'-OH-nucleótido, un 2'-desoxi-nucleótido o un 2'-fluoro-nucleótido; un 2'-fluoro-nucleótido sustituido por un 2'-OH-nucleótido, un 2'-desoxi-nucleótido o un 2'-OMe-nucleótido; o un 2'-O-metoxietil-nucleótido sustituido por un 2'-OH-, 2'-fluoro- o 2'-desoxi-nucleótido; un 2'-O-metoxietil-nucleótido o desoxi-nucleótido por un 2'-fluoro-nucleótido; y la adición de uno o más PEG u otros polímeros u otra entidad que influye en la distribución o la PK.

En realizaciones adicionales, la etapa de introducción de estos métodos incluye además introducir más de una sustitución química en uno o más sitios de escisión o en un solo sitio de escisión o en ambos.

En otra realización, en la que se detecta más de un sitio de escisión de aptámero, la etapa de introducción de estos métodos incluye además introducir al menos una sustitución química en la posición proximal asociada del sitio de escisión de aptámero que se determina que se produce en primer lugar en el tiempo durante la etapa de incubación o en cualquier otro sitio de escisión que proporcione las propiedades deseadas tras la introducción de una sustitución química.

En otras realizaciones, estos métodos incluyen además la etapa de someter a prueba la estabilidad del aptámero modificado en el fluido de prueba. En algunas realizaciones, la estabilidad del aptámero se evalúa determinando el porcentaje de aptámero modificado que permanece intacto en el fluido de prueba en comparación con el porcentaje del aptámero original que permanece intacto en el fluido de prueba. En algunas realizaciones, el porcentaje de aptámero intacto se evalúa mediante un método bioanalítico seleccionado del grupo que consiste en uno o más de: electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) desnaturalizante; electroforesis capilar; HPLC y CL/EM, particularmente CL/EM/EM o CL/EM/EM/EM, y más particularmente ESI-CL/EM, ESI-CL/EM/EM y ESI-CL/EM/EM/EM. En otras realizaciones, el aptámero modificado es más estable en el fluido de prueba que el aptámero original, preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 veces y lo más preferiblemente al menos 10 veces más estable.

En realizaciones adicionales, estos métodos incluyen además determinar una constante de disociación o Cl_{50} del aptámero modificado para su diana. En algunas realizaciones, se introducen sustituciones químicas de manera individual en cada posición o en diversas combinaciones en el aptámero, y se determina la constante de disociación o Cl_{50} para cada aptámero resultante. Se introducen sustituciones químicas en una posición proximal al sitio de escisión de aptámero de manera que una sola modificación química da como resultado una constante de disociación para el aptámero modificado que es igual o menor que para el aptámero original. En otra realización de la invención, el método incluye seleccionar un aptámero modificado que tiene una constante de disociación o Cl_{50} para su diana que es igual o menor que para el aptámero original.

En otras realizaciones, el aptámero modificado se une a una diana que tiene una actividad biológica, y el método incluye además someter a prueba la actividad biológica de la diana en presencia y ausencia de aptámero modificado. En otra realización, el método incluye además seleccionar un aptámero modificado que se une a una diana que tiene una actividad biológica que es igual o mejor que la del aptámero original. La actividad biológica puede medirse en cualquier ensayo relevante, tal como un ensayo ELISA o un ensayo basado en células.

En algunas realizaciones, las etapas de incubación, análisis, introducción y prueba se repiten de manera iterativa hasta que se logre la estabilidad deseada.

Los aptámeros de la invención pueden adaptarse de manera rutinaria para fines de diagnóstico según cualquier número de técnicas empleadas por los expertos en la técnica. La utilización diagnóstica puede incluir tanto aplicaciones de diagnóstico *in vivo* como *in vitro*. Solo es necesario que los agentes de diagnóstico permitan que el usuario identifique la presencia de una diana dada en una ubicación o a una concentración particular. Simplemente la capacidad para formar pares de unión con la diana puede ser suficiente para desencadenar una señal positiva para fines diagnósticos. Los expertos en la técnica también serán capaces de adaptar cualquier aptámero mediante procedimientos conocidos en la técnica para incorporar una etiqueta de marcaje para rastrear la presencia de un

ligando de este tipo. Una etiqueta de este tipo podría usarse en varios procedimientos de diagnóstico.

Aptámeros que tienen motivos inmunoestimuladores

- 5 La invención proporciona aptámeros, tal como se define en las reivindicaciones, que se unen a TFPI y modulan su función biológica.

El reconocimiento del ADN bacteriano por el sistema inmunitario de vertebrados se basa en el reconocimiento de dinucleótidos de CG no metilados en contextos de secuencia particulares ("motivos CpG"). Un receptor que reconoce un motivo de este tipo es el receptor de tipo Toll 9 ("TLR 9"), un miembro de una familia de receptores de tipo Toll (~10 miembros) que participan en la respuesta inmunitaria innata reconociendo distintos componentes microbianos. TLR 9 se activa mediante secuencias CpG de oligodesoxinucleótidos ("ODN") no metilados de manera específica de secuencia. El reconocimiento de los motivos CpG desencadena mecanismos de defensa que conducen a respuestas inmunitarias innatas y en última instancia adquiridas. Por ejemplo, la activación de TLR 9 en ratones induce la activación de células presentadoras de antígeno, la regulación por incremento de moléculas del CMH de clase I y II, y la expresión de moléculas coestimuladoras importantes y citocinas incluyendo IL-12 e IL-23. Esta activación potencia tanto directa como indirectamente respuestas de células B y T, incluyendo una regulación por incremento robusta de la citocina de TH1, IFN-gamma. Colectivamente, la respuesta a secuencias CpG conduce a: protección contra enfermedades infecciosas, respuesta inmunitaria mejorada a vacunas, una respuesta eficaz contra el asma y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos mejorada. Por tanto, los ODN con CpG pueden proporcionar protección contra enfermedades infecciosas, funcionar como adyuvantes inmunológicos o agentes terapéuticos contra el cáncer (en monoterapia o en combinación con un AcM u otras terapias), y pueden disminuir el asma y la respuesta alérgica

Se han identificado una variedad de diferentes clases de motivos CpG, dando como resultado cada uno tras el reconocimiento en una cascada de acontecimientos diferente, la liberación de citocinas y otras moléculas, y la activación de determinados tipos celulares. Véase, por ejemplo, CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects, Annu. Rev. Immunol. 2002, 20:709-760. Motivos inmunoestimuladores adicionales se divulgan en las siguientes patentes estadounidenses: patente estadounidense n.º 6.207.646; patente estadounidense n.º 6.239.116; patente estadounidense n.º 6.429.199; patente estadounidense n.º 6.214.806; patente estadounidense n.º 6.653.292; patente estadounidense n.º 6.426.334; patente estadounidense n.º 6.514.948 y patente estadounidense n.º 6.498.148. Cualquiera de estos motivos CpG u otros motivos inmunoestimuladores puede incorporarse en un aptámero. La elección de aptámeros depende de la enfermedad o el trastorno que va a tratarse. Los motivos inmunoestimuladores son los siguientes (mostrados de 5' a 3', de izquierda a derecha) en los que "r" designa una purina, "y" designa una pirimidina y "X" designa cualquier nucleótido: AACGTTTCGAG (SEQ ID NO: 12); AACGTT; ACGT; rCGy; rrCGgy; XCGX; XXCGXX; y $X_1X_2CGY_1Y_2$; en las que X_1 es G o A, X_2 no es C, Y_1 no es G e Y_2 es preferiblemente T.

En aquellos casos en los que se incorpora un motivo CpG en un aptámero que se une a una diana específica distinta de una diana que se sabe que se une a motivos CpG, y que tras la unión estimula una respuesta inmunitaria (una "diana distinta de CpG"), CpG se ubica preferiblemente en una región no esencial del aptámero. Las regiones no esenciales de los aptámeros pueden identificarse mediante mutagénesis dirigida al sitio, análisis de delección y/o análisis de sustitución. Sin embargo, puede usarse cualquier ubicación que no interfiera significativamente con la capacidad del aptámero para unirse a la diana distinta de CpG. Además de estar incluido dentro la secuencia de aptámero, el motivo CpG puede agregarse a cualquiera o ambos de los extremos 5' y 3' o unirse de otro modo al aptámero. Puede usarse cualquier ubicación o medio de unión siempre que no se interfiera significativamente con la capacidad del aptámero para unirse a la diana distinta de CpG.

Tal como se usa en el presente documento, "estimulación de una respuesta inmunitaria" puede significar o bien (1) la inducción de una respuesta específica (por ejemplo, inducción de una respuesta de Th1) o la producción de determinadas moléculas, o bien (2) la inhibición o la supresión de una respuesta específica (por ejemplo, la inhibición o la supresión de la respuesta de Th2) o de determinadas moléculas.

Los aptámeros de la invención, incluyendo los aptámeros que tienen una o más CpG u otras secuencias inmunoestimuladoras, pueden identificarse o generarse mediante una variedad de estrategias usando, por ejemplo, el procedimiento SELEX™ descrito en el presente documento. Las secuencias inmunoestimuladoras incorporadas pueden ser ADN, ARN, ADN o ARN sustituido y/o una combinación de ADN/ARN sustituido o no sustituido. En general, las estrategias pueden dividirse en dos grupos. Para ambos grupos de estrategias, los motivos CpG se incluyen para: a) estimular la respuesta inmunitaria para contrarrestar situaciones en las que una respuesta inmunitaria reprimida es relevante para el desarrollo de la enfermedad (es decir, enfermedades de deficiencia inmunitaria tales como el sida), y b) para centrarse en una respuesta inmunitaria estimulada contra una diana o tipo celular particular (es decir, células de cáncer), o para desviar una respuesta inmunitaria hacia un estado de TH1 y alejado de un estado de TH2 o TH17 (es decir, incluyendo motivos CpG en un aptámero contra cualquier diana anti-alergia tal como IgE para contrarrestar un estado alérgico).

En el grupo uno, las estrategias se dirigen a identificar o generar aptámeros que incluyen tanto un motivo CpG u otra

secuencia inmunoestimuladora, así como un sitio de unión para una diana, donde la diana (a continuación en el presente documento "diana distinta de CpG") es una diana distinta de una conocida para reconocer motivos CpG u otras secuencias inmunoestimuladoras. En algunas realizaciones de la invención, la diana distinta de CpG es una diana de TFPI. La primera estrategia de este grupo incluye realizar SELEX™ para obtener un aptámero frente a una diana distinta de CpG específica, preferiblemente una diana que usa una mezcla de oligonucleótidos en la que se ha incorporado un motivo CpG en cada miembro de la mezcla como una, o como parte de una región fija, por ejemplo, en algunas realizaciones la región aleatorizada de los miembros de la mezcla incluye una región fija que tiene un motivo CpG incorporado en la misma, e identificar un aptámero que incluye un motivo CpG. La segunda estrategia de este grupo incluye realizar SELEX™ para obtener un aptámero frente a una diana distinta de CpG específica, y tras la selección, agregar un motivo CpG al extremo 5' y/o 3' u obtener por ingeniería un motivo CpG en una región, preferiblemente una región no esencial, del aptámero. La tercera estrategia de este grupo incluye realizar SELEX™ para obtener un aptámero frente a una diana distinta de CpG específica, en la que durante la síntesis de la mezcla, la razón molar de los diversos nucleótidos se desvía en una o más etapas de adición de nucleótido de modo que la región aleatorizada de cada miembro de la mezcla está enriquecida en motivos CpG, e identificar un aptámero que incluye un motivo CpG. La cuarta estrategia de este grupo incluye realizar SELEX™ para obtener un aptámero frente a una diana distinta de CpG específica, e identificar un aptámero que incluye un motivo CpG. La quinta estrategia de este grupo incluye realizar SELEX™ para obtener un aptámero frente a una diana distinta de CpG específica, e identificar un aptámero que, tras la unión, estimula una respuesta inmunitaria pero no incluye un motivo CpG.

En el grupo dos, las estrategias se dirigen a identificar o generar aptámeros que incluyen un motivo CpG y/u otras secuencias que se unen mediante los receptores para los motivos CpG (por ejemplo, TLR9 o los otros receptores de tipo Toll) y tras la unión estimulan una respuesta inmunitaria. La primera estrategia de este grupo incluye realizar SELEX™ para obtener un aptámero frente a una diana que se sabe que se une a motivos CpG u otras secuencias inmunoestimuladoras y que tras la unión estimula una respuesta inmunitaria usando una mezcla de oligonucleótidos en la que se ha incorporado un motivo CpG en cada miembro de la mezcla como una, o como parte de una región fija, por ejemplo, en algunas realizaciones la región aleatorizada de los miembros de la mezcla incluye una región fija que tiene un motivo CpG incorporado en la misma, e identificar un aptámero que incluye un motivo CpG. La segunda estrategia de este grupo incluye realizar SELEX™ para obtener un aptámero frente a una diana que se sabe que se une a motivos CpG u otras secuencias inmunoestimuladoras y que tras la unión estimula una respuesta inmunitaria y luego agregar un motivo CpG al extremo 5' y/o 3' u obtener por ingeniería un motivo CpG en una región, preferiblemente una región no esencial, del aptámero. La tercera estrategia de este grupo incluye realizar SELEX™ para obtener un aptámero frente a una diana que se sabe que se une a motivos CpG u otras secuencias inmunoestimuladoras y que tras la unión estimula una respuesta inmunitaria, en la que durante la síntesis de la mezcla, la razón molar de los diversos nucleótidos se desvía en una o más etapas de adición de nucleótido de modo que la región aleatorizada de cada miembro de la mezcla está enriquecida en motivos CpG, e identificar un aptámero que incluye un motivo CpG. La cuarta estrategia de este grupo incluye realizar SELEX™ para obtener un aptámero frente a una diana que se sabe que se une a motivos CpG u otras secuencias inmunoestimuladoras y que tras la unión estimula una respuesta inmunitaria, e identificar un aptámero que incluye un motivo CpG. La quinta estrategia de este grupo incluye realizar SELEX™ para obtener un aptámero frente a una diana que se sabe que se une a motivos CpG u otras secuencias inmunoestimuladoras, e identificar un aptámero que, tras la unión, estimula una respuesta inmunitaria pero no incluye un motivo CpG.

Modulación de la farmacocinética y la biodistribución de agentes terapéuticos de aptámero

Es importante hacer corresponder las propiedades farmacocinéticas para todos los agentes terapéuticos basados en oligonucleótidos, incluyendo aptámeros, con la aplicación farmacéutica deseada. Los aptámeros deben poder distribuirse a los órganos y tejidos diana, y permanecer en el organismo (sin modificar) durante un periodo de tiempo compatible con el régimen de dosificación deseado.

La invención proporciona materiales y métodos para afectar a la farmacocinética de las composiciones de aptámero y, en particular, a la capacidad para ajustar la farmacocinética del aptámero. La capacidad de ajuste (es decir, la capacidad para modular) de la farmacocinética del aptámero se logra a través de la conjugación de restos de modificación (por ejemplo, polímeros PEG) con el aptámero y/o la incorporación de nucleótidos modificados (por ejemplo, 2'-fluoro- o 2'-O-metil-) o uniones entre nucleótidos modificadas para alterar la composición química del aptámero. La capacidad para ajustarla farmacocinética del aptámero se usa en la mejora de aplicaciones terapéuticas existentes, o alternatively, en el desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en ámbitos sanitarios de enfermedades agudas o antineoplásicas donde puede desearse un rápido aclaramiento o desactivación del fármaco, es deseable disminuir los tiempos de residencia de los aptámeros en la circulación. Alternativamente, en otras aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, en terapias de mantenimiento donde se desea la circulación sistémica de un agente terapéutico, es deseable aumentar los tiempos de residencia de los aptámeros en la circulación.

Además, la capacidad de ajuste de la farmacocinética del aptámero se usa para modificar la disposición, por ejemplo, la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación (ADME) de un aptámero para ajustar su objetivo terapéutico en un sujeto. La capacidad de ajuste de la farmacocinética de un aptámero puede afectar a la

manera y al grado de absorción del aptámero, a la distribución de un aptámero por todos los fluidos y tejidos del organismo, a las transformaciones metabólicas sucesivas del aptámero y su(s) metabolito(s) y finalmente, a la eliminación del aptámero y su(s) metabolito(s). Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable alterar la biodistribución de un agente terapéutico de aptámero en un esfuerzo por seleccionar como diana un tipo particular de tejido o un órgano específico (o un conjunto de órganos), o para disminuir la tendencia a entrar en tipos celulares específicos. En estas aplicaciones, el agente terapéutico de aptámero se distribuye preferiblemente en tejidos y/u órganos específicos y se acumula en ellos para producir un efecto terapéutico. En otras aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable seleccionar como diana tejidos que muestran un marcador celular o un síntoma asociado con una enfermedad dada, lesión celular u otra patología anómala, de manera que el agente terapéutico de aptámero se acumula preferentemente en el tejido afectado. Por ejemplo, la pegilación de un agente terapéutico de aptámero (por ejemplo, se usa la pegilación con un polímero de PEG de 20 kDa u otro polímero o entidad de conjugación) para seleccionar como diana tejidos inflamados, de manera que el agente terapéutico de aptámero pegilado se acumula preferentemente en el tejido inflamado.

Para determinar los perfiles farmacocinéticos de los agentes terapéuticos de aptámero (por ejemplo, conjugados de aptámero o aptámeros que tienen químicas alteradas, tales como nucleótidos modificados), se estudian una variedad de parámetros en sujetos normales, por ejemplo, animales o humanos de prueba, o en sujetos enfermos, por ejemplo, modelos animales específicos de TFPI, tales como modelos animales de hipercoagulación o hipocoagulación, o humanos con una deficiencia de coagulación. Tales parámetros incluyen, por ejemplo, la semivida de distribución o eliminación ($t_{1/2}$), el aclaramiento plasmático (CL), el volumen de distribución (Vss), el área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC), la concentración en suero o plasma observada máxima ($C_{máx}$), y el tiempo de residencia medio (MRT) de una composición de aptámero. Tal como se usa en el presente documento, el término "AUC" se refiere al área bajo la curva de la concentración plasmática de un agente terapéutico de aptámero frente al tiempo tras la administración del aptámero. El valor de AUC se usa para estimar la exposición del aptámero y también se usa para determinar la biodisponibilidad de un aptámero tras una vía de administración extravascular, tal como, por ejemplo, administración subcutánea. La biodisponibilidad se determina tomando la razón de la AUC obtenida tras la administración subcutánea con respecto a la AUC obtenida tras la administración intravenosa y normalizándolas para las dosis usadas tras cada administración (es decir, la razón en porcentaje de aptámero administrado tras la administración subcutánea en comparación con el mismo aptámero administrado mediante administración intravenosa a la misma dosis o una dosis normalizada). El valor de CL es la medición de la retirada del agente terapéutico de aptámero de la circulación sistémica. El volumen de distribución (Vd) es un término que se refiere a la cantidad de aptámero en el organismo en un momento con respecto a su concentración plasmática. El Vd se usa para determinar lo bien que se retira un fármaco del plasma y se distribuye a tejidos y/u órganos. Un Vd mayor implica una amplia distribución, amplia unión a tejidos, o tanto amplia distribución como amplia unión a tejidos. Hay tres volúmenes de distribución básicos: (i) el volumen de distribución aparente o inicial a tiempo cero obtenido a partir de la extrapolación retrógrada de la curva de concentración-tiempo; (ii) el volumen calculado una vez completada la distribución, que se aproxima a Vdss, donde el volumen de área depende de la cinética de eliminación; y (iii) el volumen de distribución calculado una vez completada la distribución. El parámetro que debe medirse de manera ideal es Vdss porque este parámetro es independiente de la cinética de eliminación. Si Vss para el aptámero es mayor que el volumen de sangre, esto sugiere que el aptámero se distribuye fuera de la circulación sistémica y es probable que se encuentre en tejidos u órganos. Los parámetros farmacodinámicos también pueden usarse para evaluar las características farmacológicas.

Para determinar la distribución de los agentes terapéuticos de aptámero (por ejemplo, conjugados de aptámero o aptámeros que tienen químicas alteradas, tales como nucleótidos modificados), se usa un estudio de distribución tisular o una autorradiografía cuantitativa de todo el cuerpo usando un aptámero radiomarcado que se administra a un animal normal o a un modelo animal específico de diana enfermo. Puede cuantificarse la acumulación del aptámero radiomarcado en un sitio específico.

La farmacocinética y la biodistribución de un aptámero descrito en el presente documento, tal como un aptámero estabilizado, puede modularse de manera controlada conjugando un aptámero con un resto de modulación, tal como, pero sin limitarse a, una molécula, péptido o polímero pequeño, o mediante la incorporación de nucleótidos modificados en un aptámero. La conjugación de un resto de modificación y/o una composición química de nucleótido de alteración altera aspectos fundamentales del tiempo de residencia del aptámero en la circulación y la distribución dentro y hacia tejidos y células.

Además del metabolismo por nucleasas, los agentes terapéuticos de oligonucleótido se someten a eliminación a través de filtración renal. Como tal, un oligonucleótido resistente a nucleasas administrado por vía intravenosa normalmente muestra una semivida *in vivo* de <30 minutos, a menos que pueda bloquearse la filtración. Esto puede lograrse o bien facilitando la distribución rápida fuera del torrente circulatorio hacia tejidos o aumentando el peso molecular aparente del oligonucleótido por encima del punto de corte de tamaño eficaz para el glomérulo. La conjugación de agentes terapéuticos de peso molecular pequeño con un polímero de PEG (pegilación), tal como se describe a continuación, puede alargar drásticamente los tiempos de residencia de aptámeros en la circulación, disminuyendo de ese modo la frecuencia de dosificación y potenciando la eficacia contra dianas vasculares.

También pueden usarse nucleótidos modificados para modular el aclaramiento plasmático de aptámeros. Por

ejemplo, un aptámero no conjugado que incorpora, por ejemplo, químicas de estabilización con 2'-fluoro, 2'-OMe y/o fosforotioato, que es típico de los aptámeros de generación actuales ya que muestra un alto grado de resistencia a nucleasas *in vitro* e *in vivo*, presenta rápida distribución a los tejidos, principalmente al hígado y al riñón, cuando se compara con un aptámero no modificado.

Ácidos nucleicos derivatizados con PAG

Tal como se describió anteriormente y tal como se muestra en la figura 11, la derivatización de ácidos nucleicos con polímeros no inmunogénicos de alto peso molecular tiene el potencial de alterar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los ácidos nucleicos convirtiéndolos en agentes terapéuticos más eficaces y/o más seguros. Los cambios favorables en la actividad pueden incluir resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, filtración disminuida por los riñones, exposición disminuida al sistema inmunitario y distribución alterada del agente terapéutico por el organismo.

Las composiciones de aptámero de la invención pueden derivatizarse con uno o más restos de polialquilenglicol ("PAG"). Los polímeros típicos usados en la invención incluyen polietilenglicol ("PEG"), también conocido como óxido de polietileno ("PEO") y propilenglicol (incluyendo poliisopropilenglicol). Adicionalmente, pueden usarse copolímeros al azar o de bloque de diferentes óxidos de alquileo en muchas aplicaciones. De manera común, un polialquilenglicol, tal como PEG, es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos hidroxilo: HO-CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-OH. Este polímero, alfa-, omega-dihidroxipolietilenglicol, también puede representarse como HO-PEG-OH, donde se entiende que el símbolo -PEG- representa la siguiente unidad estructural: -CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-, donde n oscila normalmente entre 4 y 10.000.

Los polímeros de PAG adecuados para indicaciones terapéuticas normalmente tienen las propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos, carecen de toxicidad y carecen de inmunogenicidad. Un uso de PAG es unir covalentemente el polímero a moléculas insolubles para hacer que el "conjugado" de molécula de PAG resultante sea soluble. Por ejemplo, se ha demostrado que el fármaco paclitaxel insoluble en agua, cuando se acopla a PEG, se vuelve soluble en agua. Greenwald, *et al.*, J. Org. Chem., 60:331-336 (1995). Los conjugados de PAG se usan a menudo no solo para potenciar la solubilidad y la estabilidad, sino también para prolongar la semivida en la circulación sanguínea de las moléculas y la distribución posterior dentro del organismo.

Los compuestos derivatizados con PAG conjugados con los aptámeros de la invención tienen normalmente un tamaño de entre 5 y 80 kDa, sin embargo puede usarse cualquier tamaño, dependiendo de la elección del aptámero y de la aplicación. Otros compuestos derivatizados con PAG usados en la invención tienen un tamaño de entre 10 y 80 kDa. Todavía otros compuestos derivatizados con PAG usados en la invención tienen un tamaño de entre 10 y 60 kDa. En algunas realizaciones, los restos de PAG derivatizados con las composiciones de la invención son restos PEG que tienen un peso molecular que oscila entre 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 kDa de tamaño. En algunas realizaciones, el PEG es PEG lineal, mientras que en otras realizaciones, el PEG es PEG ramificado. Todavía en otras realizaciones, el PEG es un PEG ramificado de 40 kDa tal como se representa en la figura 6. En algunas realizaciones, el PEG ramificado de 40 kDa se une al extremo 5' del aptámero tal como se representa en la figura 7.

La producción de PEG de alto peso molecular (>10 kDa) puede ser difícil, ineficaz y caro. Para sintetizar los conjugados de ácido nucleico-PEG de alto peso molecular, se generan PEG activados de peso molecular superior. Los métodos para generar tales moléculas implican la formación de un PEG activado lineal o un PEG activado ramificado en el que dos o más PEG se unen a un núcleo central que porta el grupo activado. Las partes terminales de estas moléculas de PEG de peso molecular superior, es decir, los restos hidroxilo (-OH) relativamente no reactivos, pueden activarse o convertirse en restos funcionales para la unión de uno o más de los PEG u otros compuestos a los sitios reactivos en el compuesto. Los PEG activados ramificados tendrán más de dos extremos terminales, y en los casos en los que se han activado dos o más extremos terminales, tales moléculas de PEG de peso molecular superior activadas se denominan en el presente documento PEG multiactivado. En algunos casos, no se activan todos los extremos terminales en la molécula de PEG ramificada. En los casos en los que se activan dos extremos terminales cualquiera de una molécula de PEG ramificada, una molécula de PEG de este tipo se denomina un PEG biactivado. En algunos casos en los que solo está activado un extremo terminal en una molécula de PEG ramificada, una molécula de PEG de este tipo se denomina monoactivada. En otros casos, la molécula de PEG lineal es difuncional y en ocasiones se denomina "diol de PEG. Las partes terminales de la molécula de PEG son restos hidroxilo relativamente no reactivo, los grupos -OH, que pueden activarse o convertirse en restos funcionales para la unión del PEG a otros compuestos en sitios reactivos en los compuestos. Tales dioles de PEG activado se denominan en el presente documento PEG homo biactivados. Las moléculas se generan usando cualquiera de una variedad de técnicas reconocidas en la técnica. Además, para activar PEG usando uno de los métodos descritos anteriormente, pueden modificarse una o ambas de las funcionalidades de alcohol terminales de la molécula de PEG para permitir diferentes tipos de conjugación con un ácido nucleico. Por ejemplo, convertir una de las funcionalidades de alcohol terminales en una amina o un tiol permite el acceso a conjugados de tiouretano o urea. Otras funcionalidades incluyen, por ejemplo, maleimidadas y aldehídos.

En muchas aplicaciones, es deseable tapar la molécula de PEG en un extremo con un resto esencialmente no

reactivo de modo que la molécula de PEG sea monofuncional (o monoactivada). En el caso de agentes terapéuticos de proteína, que generalmente presentan múltiples sitios de reacción para PEG activados, los PEG homo bifuncionales conducen a una amplia reticulación, produciendo agregados escasamente funcionales. Para generar PEG monoactivados, normalmente se sustituye un resto hidroxilo en el extremo terminal de la molécula de diol de PEG con un resto de extremo metoxilo no reactivo, $-OCH_3$. En esta realización, el polímero puede representarse por $MeO-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-OH$ y se denomina habitualmente "mPEG", donde n oscila normalmente entre 4 y 10.000.

El otro extremo terminal sin tapar de la molécula de PEG normalmente se convierte en un resto de extremo reactivo que puede activarse para su unión a un sitio reactivo sobre una superficie o una molécula, tal como una proteína, péptido u oligonucleótido.

En algunos casos, es deseable producir en este caso un reactivo de PEG bifuncional, donde un extremo de la molécula de PEG tiene un grupo reactivo, tal como una N-hidroxisuccinimida o carbonato de nitrofenilo, mientras que el extremo opuesto contiene una maleimida u otro grupo de activación. En estas realizaciones, pueden conjugarse dos funcionalidades diferentes, por ejemplo, amina y tiol, con el reactivo de PEG activado en diferentes momentos.

Composiciones farmacéuticas

La invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones, que se une a TFPI. En algunas realizaciones, las composiciones incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero farmacológicamente activo frente a TFPI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, solo o en combinación, con uno o más portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones pueden comprender uno o más aptámeros frente a TFPI. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender ARC19499. Alternativamente, las composiciones pueden comprender ARC19882. Alternativamente, las composiciones pueden comprender ARC19499 y otro aptámero frente a TFPI. En realizaciones en las que la composición incluye al menos dos aptámeros que pueden ser el mismo aptámero o dos aptámeros diferentes, los aptámeros pueden opcionalmente anclarse o acoplarse entre sí de otro modo. Preferiblemente, las composiciones comprenden ARC19499, o bien solo o bien en combinación con otro aptámero frente a TFPI. Alternativamente, las composiciones comprenden un aptámero frente a TFPI en combinación con otro agente. Preferiblemente, las composiciones comprenden ARC19499 en combinación con otro agente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a formas de sal del compuesto activo que se preparan con contraiones que no son tóxicos en las condiciones de uso y que son comparables con una formulación estable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables de aptámeros frente a TFPI incluyen clorhidratos, sulfatos, fosfatos, acetatos, fumaratos, maleatos y tartratos.

Los términos "portador farmacéuticamente aceptable", "medio farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable", tal como se usan en el presente documento, significan que son compatibles con los otros componentes de la formulación y no son perjudiciales para el receptor de la misma. Los portadores farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica. Pueden encontrarse ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, en Goodman y Gillmans, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, última edición.

Las composiciones farmacéuticas incluirán generalmente una cantidad terapéuticamente eficaz del/de los componente(s) activo(s) de la terapia, por ejemplo, un aptámero frente a TFPI de la invención que se disuelve o se dispersa en un portador o medio farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptable preferidos incluyen, pero no se limitan a, solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato y disolución de glucosa. Sin embargo, se contempla que también pueden usarse otros portadores farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de otros medios o portadores farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares. Los portadores farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, 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, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietilen-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de disolución, sales, o tampones para modificar o mantener el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la transparencia, el color, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o absorción de la formulación. Para las composiciones sólidas, los excipientes incluyen

calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

5 Las composiciones farmacéuticas se preparan según métodos convencionales de mezclado, granulación o recubrimiento, y normalmente contienen del 0,1 % al 99,9 %, por ejemplo, del 0,1 % al 75 %, del 0,1 % al 50 %, del 0,1 % al 25 %, del 0,1 % al 10 %, del 0,1 % al 5 %, preferiblemente del 1 % al 50 %, del componente activo.

10 La formulación de las composiciones farmacéuticas la conoce un experto en la técnica. Normalmente, tales composiciones pueden formularse como composiciones inyectables, o bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones; formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en el líquido antes de la inyección; como comprimidos u otros sólidos para la administración oral; como cápsulas de liberación prolongada para formulaciones de liberación lenta; o en cualquier otra forma usada actualmente, incluyendo colirios, cremas, lociones, ungüentos, compuesto inhalatorio y similares. Las composiciones también pueden formularse como supositorios usando, por ejemplo, polialquilenglicoles como portador. En algunas realizaciones, los supositorios se preparan a partir de suspensiones o emulsiones grasas. El uso de formulaciones estériles, tales como lavados basados en solución salina, por cirujanos, médicos o trabajadores sanitarios para tratar una zona particular en el campo quirúrgico también puede ser particularmente útil.

20 Las composiciones pueden formularse como formas de dosificación oral, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones. Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), el componente de fármaco activo puede combinarse con un portador farmacéuticamente aceptable, no tóxico, oral, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desea o es necesario, también pueden incorporarse a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de aluminio y magnesio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona, azúcares naturales, tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábica, tragacanto o alginato de sodio, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol y similares. Los agentes disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, almidones de goma xantana, agar, ácido algínico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes y similares. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

35 Las composiciones farmacéuticas también pueden formularse en sistemas de administración de liposomas, tales como pequeñas vesículas unilamelares, grandes vesículas unilamelares y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse de una variedad de fosfolípidos que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, una película de componentes lipídicos se hidrata con una disolución acuosa de fármaco para formar una capa lipídica que encapsula al fármaco, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.262.564. Por ejemplo, los aptámeros descritos en el presente documento pueden proporcionarse como un complejo con un compuesto lipófilo o un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico construido usando métodos conocidos en la técnica. Adicionalmente, los liposomas pueden portar aptámeros sobre su superficie para seleccionar como diana y portar agentes citotóxicos de manera interna para mediar muerte celular. Un ejemplo de complejos asociados con ácidos nucleicos se proporciona en la patente estadounidense n.º 6.011.020.

45 Las composiciones de la invención también pueden acoplarse con polímeros solubles como portadores de fármacos direccionables. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polihidroxietil-aspanamida-fenol o polietilenoóxido-polilisina sustituido con residuos de palmitoilo. Además, las composiciones de la invención pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, poli(ácido láctico), poli-épsilon-caprolactona, poli(ácido hidroxibutírico), poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros reticulados o de bloque anfipáticos de hidrogeles.

Las composiciones de la invención también pueden usarse conjuntamente con dispositivos médicos.

55 La cantidad de principio activo y de volumen de composición que va a administrarse depende del animal huésped que va a tratarse. Las cantidades precisas de compuesto activo requeridas para su administración dependen del criterio del médico y son peculiares para cada individuo.

60 Normalmente se utiliza un volumen mínimo de una composición requerido para dispersar los compuestos activos. Los regímenes adecuados para la administración también son variables, pero se tipificarán administrando inicialmente el compuesto y monitorizando los resultados y luego administrando dosis controladas adicionales a intervalos adicionales.

Administración

65 Las composiciones pueden administrarse a un vertebrado, preferiblemente a un mamífero, y más preferiblemente a

un humano. Los términos “paciente” y “sujeto” se usan de manera intercambiable a lo largo de toda la solicitud, y estos términos incluyen tanto sujetos humanos como veterinarios.

En realizaciones en las que los aptámeros frente a TFPI son aptámeros antagonistas, las composiciones de aptámero frente a TFPI proporcionadas en el presente documento se administran a los sujetos en una cantidad eficaz para inhibir, reducir, bloquear o modular de otro modo la inhibición mediada por TFPI de la coagulación sanguínea. Las composiciones de aptámero frente a TFPI pueden inhibir, reducir, bloquear o modular de otro modo, completa o parcialmente, la inhibición mediada por TFPI de la coagulación sanguínea. Se considera que los aptámeros frente a TFPI inhiben o modulan de otro modo la actividad de TFPI cuando los aptámeros producen un aumento en la generación de trombina (tal como, por ejemplo, trombina pico, potencial de trombina endógeno o tiempo de demora) con respecto al plasma hemofílico que es equivalente a al menos el 1-2 % de reemplazo de factor.

Las composiciones pueden administrarse mediante numerosas vías de administración. Tales vías de administración incluyen, pero no se limitan a, vías orales; vías tópicas, tales como intranasales, vaginales o rectales; y vías parenterales, tales como administración intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraarticular e intratecal. Las vías de administración adecuadas también pueden usarse en combinación, tal como administración intravenosa seguida por administración subcutánea. Sin embargo, la vía de administración la determina el médico que atiende. Preferiblemente, las formulaciones se administran por vía intravenosa. Lo más preferiblemente, las formulaciones se administran por vía subcutánea.

Las formas de dosificación oral pueden administrarse como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes o emulsiones.

Las formas de dosificación tópicas incluyen cremas, pomadas, lociones, aerosoles y geles para vehículos intranasales, compuestos inhalatorios o parches transdérmicos.

Las formas de dosificación parenteral incluyen jeringas precargadas y disoluciones y polvos liofilizados que se reconstituyen antes de su administración.

El régimen de dosificación que utiliza los aptámeros de la invención se selecciona según una variedad de factores incluyendo el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo y el estado médico del paciente; la gravedad del estado que va a tratarse; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el aptámero particular o la sal del mismo empleado. Un médico o veterinario experto habitual puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz del fármaco requerida para prevenir, contrarrestar o detener la progresión del estado.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse usando diversos regímenes de tratamiento. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de tiempo definido, tal como cuando un paciente no está sufriendo un episodio hemorrágico. Alternativamente, las composiciones pueden administrarse a demanda, es decir, según sea necesario, tal como cuando un paciente está sufriendo un episodio hemorrágico. En una realización alternativa adicional, las composiciones pueden administrarse como una combinación de terapia de mantenimiento y terapia a demanda. En una realización de este tipo, las composiciones pueden administrarse como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de tiempo definido hasta que se produzca una hemorragia, en cuyo caso se aumentaría la dosificación de las composiciones según sea necesario hasta que se detenga la hemorragia, momento en el cual se disminuiría de nuevo la dosificación de las composiciones hasta el nivel de mantenimiento anterior. En otra realización de este tipo, las composiciones pueden administrarse como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de tiempo definido hasta que se produzca una hemorragia, en cuyo caso se administraría al paciente otra terapia para trastorno hemorrágico (tal como factor VIII) hasta que se detenga la hemorragia, momento en el cual se interrumpiría la otra terapia para trastorno hemorrágico. Durante todo este tiempo, las composiciones continuarían administrándose como terapia de mantenimiento. Aún en otra realización de este tipo, las composiciones pueden administrarse como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de tiempo definido hasta que se produzca una hemorragia, en cuyo caso se disminuiría la dosificación de las composiciones y se administraría al paciente otra terapia para trastorno hemorrágico (tal como factor VIII) hasta que se detenga la hemorragia, momento en el cual se aumentaría de nuevo la dosificación de las composiciones hasta el nivel de mantenimiento anterior y se interrumpiría la otra terapia para trastorno hemorrágico. En otra realización de este tipo, puede administrarse otra terapia para trastorno hemorrágico (tal como factor VIII) como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de tiempo definido hasta que se produzca una hemorragia, en cuyo caso se administrarían las composiciones al paciente hasta que se detenga la hemorragia, momento en el cual se interrumpiría la terapia con las composiciones. Durante todo este tiempo, la otra terapia para trastorno hemorrágico continuaría administrándose como terapia de mantenimiento. Aún en otra realización de este tipo, puede administrarse otra terapia para trastorno hemorrágico (tal como FVIII) como terapia de mantenimiento a una dosis definida durante un periodo de tiempo definido hasta que se produzca una hemorragia, en cuyo caso se disminuiría la dosificación de la otra terapia para trastorno hemorrágico y las composiciones se administrarían al paciente hasta que se detenga la hemorragia, momento en el cual se aumentaría de nuevo la dosificación de la otra terapia para trastorno hemorrágico hasta el nivel de mantenimiento anterior y se interrumpiría la terapia con las composiciones.

Indicaciones

Las composiciones se usan para tratar, prevenir, retardar la progresión de o mejorar patologías mediadas por el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), incluyendo el tratamiento de patologías de trastorno hemorrágico que implican la inhibición mediada por TFPI de la coagulación sanguínea. Las patologías que van a tratarse, prevenirse, retardarse o mejorarse se seleccionan del grupo que consiste en: deficiencias de factor de coagulación, congénitas o adquiridas, leves o moderadas o graves, incluyendo hemofilia A (deficiencia de factor VIII), hemofilia B (deficiencia de factor IX) y hemofilia C (deficiencia de factor XI); hemofilia A o B con inhibidores; otras deficiencias de factores (V, VII, X, XIII, protrombina, fibrinógeno); deficiencia de inhibidor de α 2-plasmina; deficiencia de inhibidor del activador de plasminógeno 1; deficiencia de múltiples factores; anomalías funcionales de factor (por ejemplo, disprotrombinemia); hemorragia de las articulaciones (hemartrosis), incluyendo, pero sin limitarse a, de tobillo, codo y rodilla; hemorragia espontánea en otras ubicaciones (muscular, gastrointestinal, bucal, etc.); accidente cerebrovascular hemorrágico; hemorragia intracraneal; laceraciones y otra hemorragia asociada con traumatismo; coagulopatía por traumatismo aguda; coagulopatía asociada con cáncer (por ejemplo, leucemia promielocítica aguda); enfermedad de von Willebrand; coagulación intravascular diseminada; enfermedad hepática; menorragia; trombocitopenia y hemorragia asociada con el uso de anticoagulantes (por ejemplo, antagonistas de vitamina K, antagonistas de FXa, etc.).

Las composiciones también pueden administrarse antes, durante y/o después de una intervención médica. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse conjuntamente con (antes, durante y/o después de) intervenciones médicas, tales como: profilaxis y/o tratamiento asociado con hemorragia producida por intervenciones dentales, cirugía ortopédica incluyendo, pero sin limitarse a artroplastia (por ejemplo, artroplastia de cadera), sinovioctomía quirúrgica o con radionúclidos (RSV), cirugía mayor, venopunción, transfusión y amputación.

Fundamento terapéutico

Sin querer restringirse a la teoría con respecto al mecanismo de acción, se ofrece el siguiente fundamento terapéutico únicamente a modo de ejemplo.

Se espera que los inhibidores del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) potencien la generación de trombina a través de la vía del factor tisular/factor VIIa (también conocida como la vía extrínseca). En un individuo normal, la activación de la vía extrínseca estimula el inicio de la respuesta de generación de trombina, dando como resultado una pequeña cantidad de trombina activada. Tras el inicio, esta vía se desactiva rápidamente por la acción inhibitoria de TFPI. La propagación posterior de la respuesta de generación de trombina depende de la activación de retroalimentación mediada por trombina de la vía intrínseca, que incluye el factor VIII (FVIII) y el factor IX (FIX). La propagación es necesaria para generar una cantidad suficientemente grande de trombina para catalizar la formación de un coágulo estable. Los individuos con una deficiencia de o bien factor VIII (hemofilia A) o bien factor IX (hemofilia B) tienen una respuesta de propagación alterada. Los individuos con una deficiencia grave (<1 %) no pueden producir trombina a través de la vía intrínseca que es dependiente de estas proteínas. Este estado da como resultado la incapacidad para producir trombina suficiente para tener una activación de plaquetas activada, generación de fibrina y formación de coágulo estable. Sin embargo, estos individuos tienen una vía extrínseca intacta. La inhibición de TFPI podría permitir la continuación de la respuesta de inicio y habilitar que se produzca la propagación a través de la vía extrínseca, permitiendo que una generación suficiente de trombina reemplace parcial o completamente la vía intrínseca deficiente y por tanto reduzca el riesgo de hemorragia. Los individuos con deficiencias leves o moderadas en estos factores, que también están en riesgo de hemorragia aumentada, también pueden beneficiarse de la coagulación sanguínea potenciada producida por la inhibición de TFPI. Además, en pacientes con las vías intrínseca y extrínseca normales que padecen hemorragias por otros motivos, tales como traumatismo, la inhibición de TFPI puede proporcionar un estímulo hemostático que podría controlar la hemorragia. Los pacientes con otras deficiencias de factores de coagulación, deficiencias de plaquetas y efectos vasculares asociados con hemorragia, también podrían beneficiarse de un tratamiento que inhiba TFPI.

Terapia de combinación

Una realización de la invención comprende un aptámero frente a TFPI, tal como se define en las reivindicaciones, o una sal del mismo o una composición farmacéutica usada en combinación con uno o más de otros tratamientos para enfermedades o trastornos hemorrágicos, tales como otros factores procoagulantes u otros inhibidores de las moléculas reguladoras de la cascada de coagulación. Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse en combinación con otro fármaco, tal como: concentrados de complejo protrombínico activado (APCC), actividad contrainhibidora del factor VIII (FEIBA[®]), factor VIIa recombinante (por ejemplo, Novoseven[®]), factor VII recombinante (Advate[®], Kogenate[®], Recombinate[®], Helixate[®], ReFacto[®]), factor VII derivado de plasma (Humate P[®], Hemofil M[®]), factor IX recombinante (BeneFIX[®]), factor IX derivado de plasma (Bebulin VH[®], Konyne[®], Mononine[®]), crioprecipitado, acetato de desmopresina (DDAVP), ácido épsilon-aminocaproico o ácido tranexámico. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en combinación con otra terapia, tal como: transfusión de sangre o hemoderivados, plasmaféresis, terapia de inducción de tolerancia inmunitaria con altas dosis de factor de reemplazo, terapia de tolerancia inmunitaria con agentes inmunosupresores (por ejemplo, prednisona,

rituximab) o terapia contra el dolor. En general, serán adecuadas las formas de dosificación disponibles actualmente de los agentes terapéuticos conocidos y los usos de terapias no farmacológicas para su uso en tales combinaciones.

“Terapia de combinación” (o “terapia conjunta”) incluye la administración de un aptámero frente a TFPI y al menos un segundo agente o tratamiento como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar el efecto beneficioso de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos o tratamientos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, acción conjunta farmacocinética o farmacodinámica que resulta de la combinación del agente terapéutico o los tratamientos. La administración de estos agentes terapéuticos o tratamientos en combinación normalmente se lleva a cabo a lo largo de un periodo de tiempo definido (habitualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada).

La terapia de combinación puede estar destinada, aunque generalmente no lo está, a englobar la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos o tratamientos como parte de regímenes de monoterapia separados que por otro lado y de manera arbitraria dan como resultado las combinaciones de la invención. Se pretende que la terapia de combinación abarque la administración de los agentes terapéuticos o tratamientos de manera secuencial. Es decir, en la que cada agente terapéutico o tratamiento se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos o tratamientos, o al menos dos de los agentes terapéuticos o tratamientos, de manera sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea puede llevarse a cabo, por ejemplo, administrando al sujeto una sola inyección que tiene una razón fija de cada agente terapéutico o inyecciones individuales, múltiples, para cada uno de los agentes terapéuticos.

La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico o tratamiento puede efectuarse mediante cualquier vía apropiada incluyendo, pero sin limitarse a, vías tópicas, vías orales, vías intravenosas, vías subcutáneas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de membranas mucosas. Los agentes terapéuticos o tratamientos pueden administrarse mediante la misma vía o mediante vías diferentes. Por ejemplo, un primer agente terapéutico o tratamiento de la combinación seleccionada puede administrarse mediante inyección mientras que los otros agentes terapéuticos o tratamientos de la combinación pueden administrarse por vía subcutánea. Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos o tratamientos pueden administrarse por vía subcutánea o todos los agentes terapéuticos o tratamientos pueden administrarse mediante inyección. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos o los tratamientos no es crítica, a menos que se indique otra cosa.

La terapia de combinación también puede abarcar la administración del agente terapéutico o los tratamientos tal como se describió anteriormente en combinación adicional con otros principios biológicamente activos. Cuando la terapia de combinación comprende un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se logre un efecto beneficioso a partir de la acción conjunta de la combinación del agente terapéutico y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso se logra todavía cuando el tratamiento no farmacológico se retira temporalmente de la administración del agente terapéutico, quizá durante días o incluso semanas.

Agentes de reversión

La divulgación se refiere además a agentes que invierten los efectos de los aptámeros frente a TFPI, denominados en el presente documento “agentes de reversión de TFPI”. El agente puede ser cualquier tipo de molécula, tal como una proteína, anticuerpo, compuesto orgánico de molécula pequeña o un oligonucleótido.

Preferiblemente, un agente de reversión de TFPI es un ácido nucleico que tiene 10-15 nucleótidos de longitud. Sin embargo, no hay límites en cuanto a la longitud del agente de reversión.

Preferiblemente, un agente de reversión de TFPI se une a un aptámero frente a TFPI. Un agente de reversión de TFPI puede unirse a un aptámero frente a TFPI de longitud completa o a un fragmento del mismo. Una unión de este tipo puede ser a través de interacciones iónicas, unión covalente, apareamiento de bases complementarias, enlace de hidrógeno, o cualquier otro tipo de unión química. Preferiblemente, una unión de este tipo es a través de apareamiento de bases complementarias. Sin querer restringirse a la teoría, el agente de reversión de TFPI actúa hibridándose con un aptámero frente a TFPI, alterando de ese modo la estructura secundaria y terciaria del aptámero frente a TFPI e impidiendo la unión del aptámero frente a TFPI a TFPI. Impidiendo la unión del aptámero frente a TFPI a TFPI, puede modularse el efecto de la interacción de unión, por ejemplo, el efecto terapéutico y/o la estimulación o inhibición de la vía molecular, proporcionando un medio para controlar el grado de la interacción de unión y el efecto asociado.

Un agente de reversión de TFPI puede ser un ácido ribonucleico, ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico y desoxirribonucleico mixtos. Preferiblemente, un agente de reversión de TFPI es monocatenario. Preferiblemente, un agente de reversión de TFPI comprende todos los residuos de 2'-O-metilo y una 3'-desoxitimidina invertida. Sin embargo, un agente de reversión de TFPI puede contener cualquier nucleótido, modificado o no modificado, junto con cualquier otra modificación en 3' o 5' que puede encontrarse en aptámeros.

Los ejemplos de agentes de reversión de TFPI incluyen, pero no se limitan a: SEQ ID NO: 15, que es ARC23085; SEQ ID NO: 16, que es ARC23087; SEQ ID NO: 17, que es ARC23088; y SEQ ID NO: 18, que es ARC23089.

Preferiblemente, el agente de reversión de TFPI es un ácido nucleico que comprende la estructura expuesta a continuación: mA-mG-mC-mC-mA-mA-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mC-mC (SEQ ID NO: 15), en la que "mN" es un residuo que contiene 2'-O-metilo (que también se conoce en la técnica como un residuo que contiene 2'-OMe, 2'-metoxi o 2'-OCH₃).

Alternativamente, el agente de reversión de TFPI es un ácido nucleico que comprende la estructura expuesta a continuación: mU-mA-mU-mA-mU-mA-mC-mG-mC-mA-mC-mC-mU-mA-mA (SEQ ID NO: 16), en la que "mN" es un residuo que contiene 2'-O-metilo.

Alternativamente, el agente de reversión de TFPI es un ácido nucleico que comprende la estructura expuesta a continuación: mC-mU-mA-mA-mC-mG-mA-mG-mC-mC (SEQ ID NO: 17), en la que "mN" es un residuo que contiene 2'-O-metilo.

Alternativamente, el agente de reversión de TFPI es un ácido nucleico que comprende la estructura expuesta a continuación: mC-mA-mC-mC-mU-mA-mA-mC-mG-mA-mG-mC-mC-mA-mA (SEQ ID NO: 18), en la que "mN" es un residuo que contiene 2'-O-metilo.

El nombre químico de ARC23085 es 2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-citidililo.

El nombre químico de ARC23087 es 2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenililo.

El nombre químico de ARC23088 es 2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-citidililo.

El nombre químico de ARC23089 es 2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-uracilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-ade-nilil-(3'→5')-2'-OMe-guanilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-citidilil-(3'→5')-2'-OMe-adenilil-(3'→5')-2'-OMe-adenililo.

La divulgación también incluye agentes de reversión de TFPI que tienen una identidad del 70 % o más con una cualquiera de las SEQ ID NO: 15, 16, 17 o 18. Por ejemplo, los agentes de reversión de TFPI pueden tener una identidad del 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95 o el 100 % con una de las SEQ ID NO: 15, 16, 17 o 18.

La divulgación también incluye composiciones farmacéuticas que contienen agentes de reversión de TFPI que se unen a aptámeros frente a TFPI. En algunas realizaciones, las composiciones incluyen una cantidad eficaz de un agente de reversión de TFPI farmacológicamente activo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, solo o en combinación, con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las composiciones pueden contener uno o más agentes de reversión de TFPI diferentes. Los agentes de reversión de TFPI se administran a sujetos en una cantidad eficaz para revertir el efecto terapéutico del aptámero frente a TFPI. Las composiciones pueden administrarse mediante numerosas vías de administración, tal como, por ejemplo, por vía tópica, intranasal o parenteral. El régimen de dosificación para un agente de reversión de TFPI dependerá de una variedad de factores incluyendo el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo y el estado médico del paciente; la gravedad del estado que va a tratarse; la vía de administración, la función renal y hepática del paciente; la cantidad de aptámero frente a TFPI usado para tratar a un paciente; y el agente de reversión de TFPI particular o sal del mismo empleado. Un médico o veterinario experto habitual puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz del agente de reversión de TFPI requerida para revertir el efecto terapéutico de un aptámero frente a TFPI.

La divulgación incluye además agentes que neutralizan la actividad hemostática del aptámero frente a TFPI. Un agente de este tipo puede unirse a TFPI e impedir su inhibición mediante el aptámero frente a TFPI, o el agente puede inhibir factores de coagulación posteriores (por ejemplo, FXa o trombina) de manera que contrarreste la actividad hemostática del aptámero frente a TFPI. Un agente de este tipo puede incluir, pero no se limita a, anticoagulantes, tales como heparina no fraccionada o heparina de bajo peso molecular. Un estudio realizado por Wesselschmidt (Wesselschmidt *et al.*, "Structural requirements for factor pathway inhibitor interactions with factor Xa and heparin", Blood Coagul Fibrinolysis, vol. 4, págs. 661-669 (1993)) muestra que la heparina se une a TFPI a través de interacciones con los dominios K3 y C-terminal, lo que podría interferir o bien directamente o bien indirectamente con la capacidad de los aptámeros frente a TFPI para unirse a TFPI. Además, en el mismo estudio,

se observó que la unión de heparina facilitaba la actividad inhibidora de FXa de TFPI, lo que tendería a contrarrestar adicionalmente la actividad hemostática de los aptámeros frente a TFPI. Finalmente, se conoce bien que la heparina inhibe la trombina, el FXa y otros factores de coagulación a través de un mecanismo dependiente de antitrombina. Estas actividades podrían neutralizar la capacidad de los aptámeros frente a TFPI para estimular la generación de trombina y la formación de coágulo. En el caso de que los efectos hemostáticos de los aptámeros frente a TFPI fueran inducir trombosis, podría administrarse uno de estos agentes para detener su progresión. Un médico o veterinario experto habitual puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz del anticoagulante u otro agente neutralizante, requerida para revertir el efecto hemostático de un aptámero frente a TFPI.

10 Kits

Las composiciones farmacéuticas también pueden envasarse en un kit. El kit comprenderá la composición, junto con instrucciones con respecto a la administración del aptámero frente a TFPI. El kit también puede comprender uno o más de lo siguiente: una jeringa o jeringa precargada, una bolsa o botella intravenosa, un vial, el mismo aptámero frente a TFPI en una forma de dosificación diferente u otro aptámero frente a TFPI. Por ejemplo, el kit puede comprender tanto una formulación intravenosa como una formulación subcutánea de un aptámero frente a TFPI de la invención. Alternativamente, el kit puede comprender aptámero frente a TFPI liofilizado y una bolsa intravenosa de solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato. La forma del kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados deben administrarse en diferentes formas de dosificación (es decir, parenteral y oral) o se administran a diferentes intervalos de dosificación. El kit puede comprender además un agente de reversión de TFPI, junto con instrucciones con respecto a la administración del agente de reversión. El kit puede contener tanto una formulación intravenosa como una formulación subcutánea del agente de reversión de TFPI. Alternativamente, el kit puede contener agente de reversión de TFPI liofilizado y una bolsa de disolución intravenosa.

Preferiblemente, los kits se almacenan a 5 ± 3 °C. Los kits también pueden almacenarse a temperatura ambiente o congelarse a -20 °C.

TFPI de regulación

La invención también proporciona un método para regular TFPI en el que una molécula se une o interacciona de otro modo con una o más partes de TFPI, en el que al menos una parte está fuera de los dominios K1 y K2 de TFPI, tal como la región K3/C-terminal. La molécula es un aptámero, tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, la molécula puede unirse a o interaccionar de otro modo con una parte lineal o una parte conformacional de TFPI. Una molécula se une a o interacciona de otro modo con una parte lineal de TFPI cuando la molécula se une a o interacciona de otro modo con un tramo contiguo de residuos de aminoácido que están unidos mediante enlaces peptídicos. Una molécula se une a o interacciona de otro modo con una parte conformacional de TFPI cuando la molécula se une a o interacciona de otro modo con residuos de aminoácido no contiguos que se acercan mediante plegamiento u otros aspectos de la estructura secundaria y/o terciaria de la cadena polipeptídica. Preferiblemente, la molécula se une al menos en parte a una o más partes del TFPI maduro (por ejemplo, figura 3A) que se seleccionan del grupo que consiste en: aminoácidos 148-170, aminoácidos 150-170, aminoácidos 155-175, aminoácidos 160-180, aminoácidos 165-185, aminoácidos 170-190, aminoácidos 175-195, aminoácidos 180-200, aminoácidos 185-205, aminoácidos 190-210, aminoácidos 195-215, aminoácidos 200-220, aminoácidos 205-225, aminoácidos 210-230, aminoácidos 215-235, aminoácidos 220-240, aminoácidos 225-245, aminoácidos 230-250, aminoácidos 235-255, aminoácidos 240-260, aminoácidos 245-265, aminoácidos 250-270, aminoácidos 255-275, aminoácidos 260-276, aminoácidos 148-175, aminoácidos 150-175, aminoácidos 150-180, aminoácidos 150-185, aminoácidos 150-190, aminoácidos 150-195, aminoácidos 150-200, aminoácidos 150-205, aminoácidos 150-210, aminoácidos 150-215, aminoácidos 150-220, aminoácidos 150-225, aminoácidos 150-230, aminoácidos 150-235, aminoácidos 150-240, aminoácidos 150-245, aminoácidos 150-250, aminoácidos 150-255, aminoácidos 150-260, aminoácidos 150-265, aminoácidos 150-270, aminoácidos 150-275, aminoácidos 150-276, aminoácidos 190-240, aminoácidos 190-276, aminoácidos 240-276, aminoácidos 242-276, aminoácidos 161-181, aminoácidos 162-181, aminoácidos 182-240, aminoácidos 182-241 y aminoácidos 182-276. La molécula comprende preferiblemente una constante de disociación para TFPI humano, o una variante del mismo, de menos de 100 μ M, menos de 1 μ M, menos de 500 nM, menos de 100 nM, preferiblemente 50 nM o menos, preferiblemente 25 nM o menos, preferiblemente 10 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, incluso más preferiblemente 1 nM o menos, y lo más preferiblemente 500 pM o menos.

La mención de publicaciones y documentos de patente no pretende admitir que cualquiera de ellos es técnica anterior pertinente, ni constituye la admisión en cuanto al contenido o la fecha de los mismos. Habiéndose descrito la invención ahora a modo de descripción por escrito, los expertos en la técnica reconocerán que la invención puede ponerse en práctica en una variedad de realizaciones y que la descripción anterior y los ejemplos a continuación son para fines de ilustración y no de limitación de las reivindicaciones que siguen.

Ejemplos

En los ejemplos, se usaron uno o más de los siguientes aptámeros frente a TFPI para llevar a cabo los diversos experimentos. ARC26835 es el aptámero descrito en SEQ ID NO: 1. ARC17480 es el aptámero descrito en SEQ ID

NO: 2. ARC19498 es el aptámero descrito en SEQ ID NO: 3. ARC19499 es el aptámero descrito en SEQ ID NO: 4. ARC19500 es el aptámero descrito en SEQ ID NO: 5. ARC19501 es el aptámero descrito en SEQ ID NO: 6. ARC26835 es la secuencia de aptámero de núcleo para cada uno de ARC17480, ARC19498, ARC19499, ARC19500 y ARC19501. ARC31301 es el aptámero descrito en SEQ ID NO: 7. ARC18546 es el aptámero descrito en SEQ ID NO: 8. ARC19881 es el aptámero descrito en SEQ ID NO: 9. ARC19882 es el aptámero descrito en SEQ ID NO: 10. ARC31301 es la secuencia de aptámero de núcleo para cada uno de ARC18546, ARC19881 y ARC19882.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra cómo se generó ARC19499.

Se realizaron experimentos de selección *in vitro* usando una mezcla de moléculas de oligonucleótido modificadas, cada una de las cuales contenía residuos dC, mA, mG y mU, e inhibidor de la vía del factor tisular humano (TFPI) recombinante, que se obtuvo de American Diagnostica (n.º de catálogo 4500PC, Stamford, CT). Se realizaron rondas iterativas de selección para unirse a TFPI, seguido por amplificación, para generar ARC14943, un precursor de 84 nucleótidos de longitud de ARC19499. Se minimizó ARC14943 desde 84 nucleótidos hasta 32 nucleótidos (ARC26835) usando programas de predicción de plegamiento informáticos y delección sistemática. El apéndice de un residuo de 3'-desoxitimidina invertido a ARC26835 dio como resultado ARC17480, una molécula de 33 nucleótidos de longitud. La adición de un grupo 5'-hexilamina a ARC17480 dio como resultado ARC19498. Entonces se pegiló esta molécula a través del grupo 5'-hexilamina con un resto PEG de 40 kD dando como resultado ARC19499.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que ARC17480 se une estrechamente a TFPI *in vitro* en un experimento de unión de transferencia puntual, tanto en ausencia como en presencia de ARNt competidor.

Se incubó ARC17480 radiomarcado con diferentes concentraciones de TFPI. Entonces se capturó ARC17480 unido a TFPI sobre una membrana de filtro de nitrocelulosa. Se determinó y representó gráficamente la razón de ARC17480 radiomarcado unido al filtro de nitrocelulosa con respecto al ARC17480 radiomarcado total añadido como el porcentaje de ARC17480 unido en función de la concentración de proteína. Se muestra un ejemplo de una representación gráfica de unión de ARC17480/TFPI en la figura 12A. Los datos se ajustaron a modelos para la unión de aptámero-proteína monofásica y bifásica. Este experimento se repitió once veces y se determinaron las K_D usando tanto modelos de unión monofásicos como bifásicos para cada conjunto de datos. La K_D media determinada usando un ajuste monofásico fue de $4,0 \pm 1,5$ nM y usando un ajuste bifásico fue de $1,7 \pm 0,7$ nM. Tanto los ajustes monofásicos como los bifásicos a los datos suponen modelos diferentes para la interacción de ARC17480 con TFPI, aunque los ajustes en sí mismos no respaldan explícitamente ningún modelo de unión. Independientemente del modelo usado para ajustar los datos, la K_D determinada para la unión de ARC17480 con TFPI fue esencialmente la misma. Cuando se tuvieron en cuenta las K_D determinadas a partir tanto de ajustes monofásicos como bifásicos, la K_D media de unión de ARC17480 a TFPI fue de $2,9 \pm 1,6$ nM. Esta K_D media no supone un modo de interacción de unión entre ARC17480 y TFPI y, como tal, es la determinación de la interacción de unión entre el aptámero y la proteína más robusta. ARC17480 mantuvo la unión a TFPI humano en presencia de ARNt, lo que indica que la unión era específica. Se observó un cambio en la afinidad de unión de ARC17480 a TFPI en presencia de ARNt 0,1 mg/ml con una K_D media de 42 ± 12 nM. Se muestra una representación gráfica de ejemplo de unión de ARC17480 a TFPI tanto en presencia como ausencia de ARNt en la figura 12B.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que ARC17480, ARC19498, ARC19499, ARC26835, ARC19500, ARC19501, ARC31301, ARC18546, ARC19881 y ARC19882 no marcados compiten con ARC17480 radiomarcado para unirse a TFPI. Este ejemplo también demuestra que todos estos aptámeros tienen afinidades por TFPI que son similares a las observadas con ARC17480.

Se evaluó cada aptámero para determinar la unión a TFPI en un ensayo de competencia de unión. Para estos experimentos, se incubó TFPI humano (American Diagnostica, Stamford, CT, n.º de catálogo 4500PC) con cantidades traza de ARC17480 radiomarcado y diferentes concentraciones de aptámero competidor no marcado (5000 nM-0,25 nM para todos los aptámeros excepto ARC19499; 1000 nM-0,05 nM para ARC19499). Para experimentos con ARC17480 y ARC19499 en la figura 13A, se usó TFPI 60 nM. Para el resto de los experimentos (figura 13B-E), se usó TFPI 10 nM. Se incluyó ARC17480 como competidor en cada experimento como control. Para cada aptámero, se usó para el análisis el porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido a cada concentración de aptámero competidor. Se representó gráficamente el porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido en función de la concentración de aptámero y se ajustó a la ecuación $y = (\text{máx}/(1 + x/CI_{50})) + \text{int}$, donde y = el porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido, x = la concentración de aptámero, máx = el ARC17480 radiomarcado máximo unido, e int = la ordenada en el origen, para generar un valor de CI_{50} para la competencia de unión. La figura 13A-E muestra gráficos de experimentos de competencia con ARC17480, ARC19498, ARC19499, ARC26835, ARC19500, ARC19501, ARC31301, ARC18546, ARC19881 y ARC19882. Todas estas moléculas compitieron de manera similar

con ARC17480 radiomarcado para unirse a TFPI. Estos experimentos demuestran que ARC17480, ARC19498, ARC19499, ARC26835, ARC19500, ARC19501, ARC31301, ARC18546, ARC19881 y ARC19882 se unen de manera similar a TFPI de longitud completa.

5 Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra que los aptámeros frente a TFPI se unen específicamente a TFPI.

10 En este experimento, se sometió a prueba ARC17480 para determinar la unión a una variedad de proteínas que son moléculas clave en la cascada de coagulación, moléculas cuya inhibición mostraría un perfil similar a la inhibición de TFPI, o moléculas que son similares en estructura o función a TFPI. Las proteínas investigadas fueron TFPI, factor Va (FVa), factor XII (FXII), antitrombina (ATIII), cofactor de heparina II (HCII), alfa-trombina, protrombina, factor VIIa (FVIIa), factor IXa (FIXa), factor Xa (FXa), factor XIa (FXIa), calicreína, plasmina, alfa-1 antitripsina (serpina-A1), TFPI-2, y GST-TFPI-2. En presencia de hasta 0,5-1 μ M de cada proteína, ARC17480 no tuvo ninguna afinidad significativa por la secuencia, y las proteínas mecánicamente relacionadas sometidas a prueba (figura 14A-D).
15 ARC17480 mostró algo de unión a FXII a mayores concentraciones de proteína. Se eliminó esta unión en presencia de ARNt 0,1 mg/ml (figura 14D), lo que indica que la unión era probablemente inespecífica.

20 Estos experimentos indican que cualquier efecto sobre la coagulación que esté mediado por los aptámeros frente a TFPI se debe probablemente a la unión directa y la inhibición de TFPI.

Ejemplo 5

25 Este ejemplo demuestra que ARC19499 se une estrechamente a TFPI en un ensayo de unión basado en placas. Este ejemplo también demuestra que ARC19498 se une estrechamente a TFPI debido a su competencia con ARC19499 para unirse a TFPI en un ensayo de unión basado en placas.

30 Con el fin de valorar la afinidad de unión de ARC19499 con TFPI, se diluyó proteína TFPI humana recombinante (0,5 mg/ml) en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) hasta una concentración final de 15 μ g/ml, y se añadieron 100 μ l a una placa Maxisorb de 96 pocillos y se incubó durante la noche a 4 °C. Se retiró entonces la disolución de TFPI y se lavó la placa posteriormente 3 veces con 200 μ l de tampón de lavado (DPBS + Tween 20 al 0,05 %) a temperatura ambiente. Entonces se bloqueó la placa con 200 μ l de albúmina sérica bovina 10 mg/ml (BSA) en DPBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se retiró la disolución de bloqueo con BSA y se lavó la placa de nuevo 3 veces con 200 μ l de tampón de lavado. Se añadió entonces ARC19499 diluido en serie en DPBS con BSA al 0,1 % a la placa y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de lavar 3
35 veces con 200 μ l de tampón de lavado, se añadieron 100 μ l de anticuerpo monoclonal anti-PEG de conejo 0,5 μ g/ml (Epitomics) a la placa y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se retiró entonces la disolución de anticuerpo anti-PEG y se lavó la placa tal como se describió anteriormente. Entonces, se añadieron 100 μ l de anticuerpo secundario anti-IgG-HRP de conejo (Cell Signaling Technology), diluido 1000 veces en tampón de ensayo, a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos. Después de lavar 3 veces con 200 μ l de tampón de lavado, se añadieron 100 μ l de disolución de TMB (Pierce) a cada pocillo y se incubó durante 2 minutos antes de
40 añadir 100 μ l de disolución de parada (H_2SO_4 2 N) a cada pocillo para detener la reacción. Entonces se leyó la placa de ensayo a 450 nm usando un dispositivo de recuento de marcaje múltiple Victor³V 1420 (Perkin Elmer). Cinco experimentos de unión diferentes sugirieron que la afinidad de unión entre ARC19499 y TFPI recombinante es de 30 nM en el ensayo de unión basado en placas. Los datos de uno de estos experimentos se muestran en la figura
45 15.

50 Con el fin de valorar la afinidad de ARC19498 hacia la proteína TFPI, se estableció un ensayo de competencia de unión de ARC19499:TFPI. Se diluyó la proteína TFPI humana recombinante (0,5 mg/ml) en DPBS hasta una concentración final de 15 μ g/ml, y se añadieron 100 μ l a una placa Maxisorb de 96 pocillos y se incubó durante la noche a 4 °C. Se retiró entonces la disolución de TFPI y se lavó la placa posteriormente 3 veces con 200 μ l de tampón de lavado (DPBS + Tween 20 al 0,05 %) a temperatura ambiente. Entonces se bloqueó la placa con 200 μ l de BSA 10 mg/ml en DPBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se retiró la disolución de bloqueo con BSA y se lavó la placa de nuevo 3 veces con 200 μ l de tampón de lavado. Se diluyó en serie ARC19498 y se
55 mezcló a diferentes concentraciones con ARC19499 20 nM en DPBS en BSA al 0,1 %. Se añadieron mezclas de ARC19498:ARC19499 a la placa y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces con 200 μ l de tampón de lavado, se añadieron 100 μ l de anticuerpo monoclonal anti-PEG de conejo 0,5 μ g/ml (Epitomics) a la placa y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se retiró entonces la disolución de anticuerpo anti-PEG y se lavó la placa tal como se describió anteriormente. Entonces, se añadieron 100 μ l de anticuerpo secundario anti-IgG-HRP de conejo (Cell Signaling Technology), diluidos 1000 veces en tampón de
60 ensayo, a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos. Después de lavar 3 veces con 200 μ l de tampón de lavado, se añadieron 100 μ l de disolución de TMB (Pierce) a cada pocillo y se incubaron durante 2 minutos antes de añadir 100 μ l de disolución de parada (H_2SO_4 2 N) a cada pocillo para detener la reacción. Entonces se leyó la placa de ensayo a 450 nm usando un dispositivo de recuento de marcaje múltiple Victor³V 1420 (Perkin Elmer). Se calculó

el porcentaje de inhibición de la unión de ARC19499 usando ARC19498 0 nM en ARC19499 20 nM como el 0 % de inhibición, y ARC19498 0 nM y ARC19499 0 nM como el 100 % de inhibición. Se calculó la CI_{50} basándose en logística de 4 parámetros usando el software Prism 4 de Graphpad. La figura 16 muestra dos réplicas de este experimento, que dieron ambas una CI_{50} de 20 nM para la competencia de ARC19498 con ARC19499 en este ensayo. Estos resultados sugieren que ARC19498 tiene una afinidad de unión por TFPI en el ensayo de unión basado en placas que es similar a la observada para ARC19499.

Ejemplo 6

Este ejemplo examina las regiones en TFPI en las que se une ARC17480. Se llevaron a cabo experimentos de unión de transferencia puntual con ARC17480 radiomarcado y diversas proteínas de TFPI truncadas, y se llevaron a cabo experimentos de competencia de unión con ARC17480 radiomarcado, TFPI, y heparina o heparina de bajo peso molecular (LMWH). Las proteínas usadas para los experimentos de unión se describen en la tabla 1 a continuación.

Se incubaron cantidades traza de ARC17480 radiomarcado con diferentes concentraciones (500 nM-0,7 nM) de TFPI de longitud completa y TFPI-His (tabla 1). La figura 17A muestra que ARC17480 tenía unión reducida a TFPI-His en comparación con su unión a TFPI de longitud completa. Este experimento sugirió que los 20 aminoácidos C-terminales de TFPI, que faltan en TFPI-His, pero están presentes en TFPI de longitud completa, contribuyen a la unión de ARC17480 a TFPI.

Se incubaron cantidades traza de ARC17480 radiomarcado con diferentes concentraciones de TFPI-K1K2 truncado (500 nM-0,008 nM) y la proteína del dominio K3-C-terminal (500 nM-0,7 nM) (tabla 1). La figura 17B muestra que ARC17480 no tenía unión detectable a TFPI-K1K2 truncado y unión muy débil a la proteína del dominio K3-C-terminal que solo era detectable a mayores concentraciones de la proteína. Se incubaron cantidades traza de ARC17480 radiomarcado con diferentes concentraciones del péptido C-terminal (10 μ M-0,17 nM) (tabla 1). Entonces se añadió neutravidina (~100 nM de monómero) a la disolución de unión para ayudar en la captura de complejos aptámero:péptido sobre un filtro de nitrocelulosa. Se cuantificó la cantidad de aptámero radiomarcado capturado sobre un filtro de nitrocelulosa y se comparó con la cantidad total de aptámero radiomarcado para generar una curva de unión, que se muestra en la figura 17B. ARC17480 mostró unión débil al péptido C-terminal a altas concentraciones de péptido.

Se incubaron cantidades traza de ARC17480 radiomarcado con diferentes concentraciones de TFPI de longitud completa (500 nM-0,008 nM) en ausencia o presencia de heparina no fraccionada 0,1 mg/ml (figura 18A). La inclusión de heparina en el experimento de unión suprimió completamente la unión de ARC17480 a TFPI. En un experimento separado, se incubaron cantidades traza de ARC17480 radiomarcado con TFPI de longitud completa 12,5 nM y diferentes concentraciones (5 μ M-0,25 nM) de heparina no fraccionada o heparina de bajo peso molecular (LMWH). La figura 18B muestra que tanto la heparina no fraccionada como LMWH compitieron con ARC17480 para unirse a TFPI de manera dependiente de la concentración. La heparina fue un competidor más eficaz que LMWH. Las regiones K3-C-terminal de TFPI se han implicado en la unión al glucocálix, y esta es la región de la proteína en la que la heparina y LMWH deben unirse. Estos experimentos sugieren que la región K3-C-terminal de TFPI es importante para la unión de ARC17480 a TFPI.

Tomados en conjunto, estos experimentos demuestran que el dominio C-terminal participa probablemente en la unión de ARC17480 a TFPI. Estos experimentos también demuestran que la región de unión de ARC17480 en TFPI no está completamente contenida dentro de la región K1-K2 de la proteína, o dentro de la región K3-C-terminal de la proteína. Las regiones requeridas para la unión de ARC17480 abarcan probablemente más de un dominio de la proteína.

Tabla 1: Proteínas usadas para los experimentos de unión

Proteína	Descripción	Aminoácidos de TFPI maduro
TFPI de longitud completa	American Diagnostica, expresado en <i>E. coli</i>	1-276
TFPI-His	R&D systems, expresado en la línea celular de mieloma murino	1-256 + cola de 10 His C-terminal
TFPI-K1K2 truncado	American Diagnostica, expresado en <i>E. coli</i>	1-161
Dominio K3-C-terminal	Expresado en <i>E. coli</i>	Cola de 6 His N-terminal + 182-276
Péptido C-terminal	sintético	Biotina N-terminal + 242-276

Ejemplo 7

Este ejemplo examina las regiones en TFPI en las que se unen ARC17480 y ARC19499. Para estos experimentos, se usaron anticuerpos que se unen a diferentes regiones en TFPI para competir por la unión a TFPI con ARC19499 en un ensayo de unión basado en placas, o para competir por la unión a TFPI con ARC17480 en un ensayo de

unión de transferencia puntual. Los anticuerpos usados para la competencia se muestran en la tabla 2 a continuación.

Este ejemplo demuestra que el anticuerpo AD4903 (American Diagnostica, n.º de catálogo 4903) compitió por la unión de ARC19499 a TFPI en un ensayo de unión basado en placas y compitió por la unión de ARC17480 a TFPI en un ensayo de unión de transferencia puntual (figura 19A y figura 20C). Se produjo el anticuerpo AD4903 contra un fragmento de TFPI que contenía los residuos de aminoácido 22-87 del dominio K1, y se une a TFPI en alguna parte en esta región (tabla 2). Este ejemplo también demuestra que el anticuerpo ACJK-4, que se produjo contra un péptido que contenía los residuos de aminoácido 148-162 que son parte de la región intermedia entre los dominios K2 y K3 de TFPI, compitió débilmente con ARC17480 para unirse a TFPI en un ensayo de unión de transferencia puntual (figura 20B). Este ejemplo también demuestra que los anticuerpos ACJK-1 y ACJK-2, que se produjeron contra péptidos que contenían los residuos de aminoácido 261-276 y 245-262, respectivamente, que son parte del dominio C-terminal de TFPI, compitieron parcialmente por la unión de ARC19499 a TFPI en un ensayo de unión basado en placas (figura 19B). Este ejemplo demuestra además que otros diversos anticuerpos que se unen a diferentes regiones de TFPI no compitieron por la unión de ARC19499 a TFPI en un ensayo de unión basado en placas, y no compitieron con ARC17480 para unirse a TFPI en un ensayo de unión basado en transferencia puntual. Se muestran los anticuerpos usados para los experimentos de competencia en la tabla 2 a continuación.

Para los experimentos de unión basados en placas, se usaron 400 ng/pocillo de TFPI (American Diagnostics, n.º de catálogo 4900PC) en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) para recubrir una placa Maxisorb de 96 pocillos a 4 °C. Se retiró entonces la disolución de TFPI y se lavó la placa posteriormente 3 veces con 200 µl de tampón de lavado (DPBS + Tween 20 al 0,05 %) a temperatura ambiente. Entonces se bloqueó la placa con 200 µl de albúmina sérica bovina 10 mg/ml (BSA) en DPBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se retiró la disolución de bloqueo con BSA y se lavó la placa 3 veces con 200 µl de tampón de lavado. Se diluyeron en serie los anticuerpos de competencia y se mezclaron con ARC19499 a la concentración final de ARC19499 25 nM y BSA al 0,1 % en DPBS, y entonces se añadió la mezcla a la placa de ensayo y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se mezcló ARC19498 de manera similar con ARC19499 y se usó como control positivo en el ensayo de competencia con anticuerpos. Se lavaron entonces los pocillos, tal como se describió anteriormente. Para los experimentos que usan los anticuerpos AD4903, AD4904 y 7035-A01 para la competencia, se añadieron 100 µl de anticuerpo monoclonal anti-PEG de conejo 0,5 µg/ml (Epitomics, n.º de catálogo 2061-1) en tampón de ensayo a la placa y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Entonces se retiró la disolución de anticuerpo anti-PEG y se lavó la placa tal como se describió anteriormente, seguido por la adición de 100 µl de anticuerpo secundario anti-IgG-HRP de conejo diluido 1:1000 en tampón de ensayo a cada pocillo (Cell Signaling Technology, n.º de catálogo 7074) y se incubó durante 30 minutos. Se retiró esta disolución de anticuerpo secundario y se lavó la placa, tal como se describió anteriormente. Para los anticuerpos ACJK1-ACJK5, se añadieron 0,5 µg/ml de 100 µl de anticuerpo monoclonal biotinilado anti-PEG de conejo (Epitomics, n.º de catálogo 2173) en tampón de ensayo a la placa de ensayo y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente, seguido por lavado, tal como se describió anteriormente. Entonces se retiró el anticuerpo y se lavó la placa tal como se describió anteriormente, seguido por la adición de 100 µl de estreptavidina-HRP (4800-30-06) de R&D systems (Mineápolis, MN) diluida 200 veces en DPBS e incubada durante 1 hora adicional a temperatura ambiente. Entonces se retiró la estreptavidina-HRP y se lavó la placa tal como se describió anteriormente. Entonces se añadieron 100 µl de disolución de TMB (Pierce, n.º 34028) a cada pocillo y se incubó durante 2 minutos, seguido por la adición de 100 µl de disolución de parada (H₂SO₄ 2 N) a cada pocillo para detener la reacción. Entonces se leyó la placa de ensayo a 450 nm usando un dispositivo de recuento de marcaje múltiple Victor³V 1420 (Perkin Elmer). Se calculó el porcentaje de inhibición de la unión usando anticuerpo 0 nM en ARC19499 25 nM como el 0 % de inhibición, y anticuerpo 0 nM y ARC19499 0 nM como el 100 % de inhibición. Se calculó la CI₅₀ basándose en logística de 4 parámetros usando el software Prism 4 de Graphpad.

Tal como se muestra en la figura 19A, el anticuerpo AD4903, que se une dentro del dominio K1 de TFPI, compitió con ARC19499 para unirse a TFPI recombinante en el ensayo de unión basado en placas. Los anticuerpos ACJK-1 y ACJK-2, que se unen a regiones dentro de la región C-terminal de TFPI, compitieron parcialmente por la unión de ARC19499 a TFPI en el ensayo de unión basado en placas (figura 19B). Los anticuerpos AD4904, ACJK-3, ACJK-4, ACJK-5 y 7035-A01 no mostraron competencia por la unión de ARC19499 a TFPI en el ensayo de unión basado en placas (figura 19A y B). Estos experimentos sugieren que la región K1 y la región C-terminal de TFPI están implicadas en la unión de ARC19499 a TFPI.

También se sometieron a prueba los anticuerpos en la tabla 2 en un ensayo de unión de competencia basado en transferencia puntual. En estos experimentos, se incubaron cantidades traza de ARC17480 radiomarcado con TFPI recombinante 10 nM, con o sin la adición de anticuerpo. Se sometieron a prueba los anticuerpos a 1000 nM, 333 nM, 111 nM, 37,0 nM, 12,4 nM, 4,12 nM, 1,37 nM, 0,46 nM, 0,15 nM y 0,051 nM. Se incluyó ARC17480 como competidor en cada experimento como control. Para cada molécula, se usó para el análisis el porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido a cada concentración de aptámero competidor. Se representó gráficamente el porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido en función de la concentración de aptámero y se ajustó a la ecuación $y = (\text{máx}/(1 + x/\text{CI}_{50})) + \text{int}$, donde y = el porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido, x = la concentración de aptámero, máx = el ARC17480 radiomarcado unido máximo, e int = la ordenada en el origen, para generar un valor de CI₅₀ para

competencia de unión. La figura 20 muestra los experimentos de competencia de unión llevados a cabo con ACJK-1, ACJK-2, ACJK-3, ACJK-4, ACJK-5, AD4903 y AD4904. Estos experimentos demuestran que el anticuerpo AD4903 compitió por la unión de ARC17480 a TFPI en el ensayo de competencia de transferencia puntual (figura 20C). ACJK-4 compitió parcialmente por la unión en este ensayo (figura 20B), mientras que ACJK-1, ACJK-2, ACJK-3, ACJK-5 y AD4904 no mostraron competencia significativa por la unión con ARC17480 (figura 20A-C). Estos experimentos sugieren que la región K1 y las regiones intermedias K2-K3 de TFPI están implicadas en la unión de ARC17480 a TFPI.

Tomados en conjunto, estos experimentos demuestran que la región K1 de TFPI está implicada probablemente en la unión de ARC17480/ARC19499 a TFPI. Estos experimentos también sugieren que las regiones intermedias K2-K3 y C-terminal de TFPI pueden estar implicadas en la unión del aptámero. La falta de competencia de unión de los anticuerpos a otras regiones de TFPI no impide su implicación en la unión de aptámeros.

Tabla 2: Anticuerpos usados en ensayos de competencia de ARC19499

Anticuerpo	Tipo	Región de TFPI maduro usado como antígeno para la generación de anticuerpos	Región diana de anticuerpo en TFPI
AD4903	monoclonal de ratón	22-87	Región K1
AD4904	monoclonal de ratón	88-160	Región K2
ACJK-1	policlonal de conejo	261-276	Péptido C-terminal
ACJK-2	policlonal de conejo	245-262	Péptido C-terminal
ACJK-3	policlonal de conejo	192-204	Péptido K3
ACJK-4	policlonal de conejo	148-162	Péptido intermedio K2-K3
ACJK-5	policlonal de conejo	54-69	Péptido K1
7035-A01	policlonal de ratón	152-252	Región K3-C-terminal

Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra que ARC19499 tiene actividad *in vitro* que inhibe TFPI en el ensayo de inhibición de tenasa extrínseca (Xasa).

En este ensayo, se mezcló factor tisular (TF) con factor VIIa (FVIIa) y vesículas de fosfolípidos. Se añadió factor X (FX) y se retiraron alícuotas y se extinguieron en diversos puntos de tiempo. En este punto, se añadió un sustrato cromogénico para el factor Xa (FXa) y se midió la absorbancia a 405 nm a lo largo del transcurso de una hora con el fin de determinar las velocidades de generación de FXa. Cuando se incluyó TFPI 1 nM, la velocidad de generación de FXa disminuyó significativamente. Esto se observa en la figura 21A cuando se comparan los rombos rellenos (sin TFPI) con los círculos en blanco (TFPI 1 nM). Cuando también se incluyeron concentraciones crecientes de ARC19499 junto con el TFPI 1 nM, hubo una mejora dependiente de la dosis en la velocidad de generación de FXa. ARC19499 100 nM (rombos en blanco) dio como resultado velocidades de generación de FXa que eran próximas a la velocidad de generación de FXa en ausencia de TFPI (rombos rellenos) (figura 21A). Estas velocidades se normalizaron dividiendo la velocidad en un punto de tiempo específico (en este caso, a los 4 minutos) entre la velocidad lograda sin TFPI en el mismo punto de tiempo (figura 21B). De esta manera, TFPI redujo la velocidad de generación de FXa a los 4 minutos en casi el 70 %. Las concentraciones crecientes de ARC19499 mejoraron esta velocidad, alcanzando niveles próximos a los de en ausencia de TFPI con aptámero 10-1000 nM (figura 21B).

Este experimento indica que ARC19499 inhibe TFPI en un ensayo de inhibición de tenasa extrínseca *in vitro*.

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra que ARC26835, ARC17480, ARC19498, ARC19499, ARC19500, ARC19501, ARC31301, ARC18546, ARC19881 y ARC19882 tienen actividad inhibidora de TFPI en el ensayo de actividad del factor Xa (FXa).

Se evaluó cada aptámero para determinar la inhibición de TFPI en un ensayo de actividad del factor Xa (FXa). Se midió la capacidad de FXa para escindir un sustrato cromogénico en presencia y en ausencia de TFPI, con o sin la adición de aptámero. Para estos experimentos, se incubó FXa humano 2 nM con TFPI humano 8 nM. Entonces, se añadieron sustrato cromogénico 500 μ M y aptámeros, y se midió la escisión por FXa del sustrato mediante absorbancia a 405 nm (A_{405}) en función del tiempo. Se sometieron los aptámeros a prueba a concentraciones de 500 nM, 125 nM, 31,25 nM, 7,81 nM, 1,95 nM y 0,49 nM. Se incluyó ARC17480 como control en cada experimento. Para cada concentración de aptámero, se representó gráficamente A_{405} en función del tiempo y se ajustó la región lineal de cada curva a la ecuación $y = mx + b$, donde $y = A_{405}$, x = la concentración de aptámero, m = la velocidad de escisión de sustrato, y b = la ordenada en el origen, para generar una velocidad de escisión de sustrato de FXa. La velocidad de escisión de sustrato por FXa en presencia de TFPI y en ausencia de aptámero se restó del valor correspondiente en presencia tanto de TFPI como de aptámero para cada aptámero a cada concentración.

Entonces, se representaron gráficamente las velocidades ajustadas en función de la concentración de aptámero y se ajustaron a la ecuación $y = (V_{\text{máx}} / (1 + CI_{50}/x))$, donde y = la velocidad de escisión de sustrato, x = concentración de aptámero, y $V_{\text{máx}}$ = la velocidad máxima de escisión de sustrato, para generar una CI_{50} y un valor máximo ($V_{\text{máx}}$). La figura 22A-C muestra gráficos de ensayos de actividad de FXa con ARC26835, ARC17480, ARC19498, ARC19499, ARC19500, ARC19501, ARC31301, ARC18546, ARC19881 y ARC19882. Todos estos aptámeros inhibieron TFPI en estos ensayos, tal como se evidencia por un aumento en la actividad de FXa en función de la concentración de aptámero. Todos estos aptámeros tenían actividad similar en el ensayo de FXa.

Ejemplo 10

Este ejemplo demuestra que ARC19499 protege al factor Xa (FXa) de la inhibición por TFPI en un ensayo cromogénico con componentes purificados.

Se incubaron FXa (1 nM), TFPI (2,5 nM), ARC19499 (0-500 nM) y sustrato cromogénico Spectrozyme Xa (American Diagnostica) (200 μ M) en solución salina tamponada con HEPES (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) que contenía $CaCl_2$ 2 mM y PEG-6.000 al 0,1 % (tampón HBSP2) a 37 °C hasta que se logró el equilibrio (5 minutos). Se determinó la velocidad de hidrólisis de Spectrozyme FXa usando un instrumento ThermoMax (Molecular Devices) y se representó gráficamente como el % de actividad de FXa en comparación con ausencia de TFPI (100 %). Las concentraciones crecientes de ARC19499 provocaron un aumento en la actividad de FXa (figura 23), demostrando que ARC19499 protegió a FXa de la inhibición por TFPI. Basándose en estos datos, la constante de disociación aparente (K_D) de ARC19499 para TFPI fue de 1,8 nM. ARC19499 es específico para TFPI y no inhibió la actividad de FXa en ausencia de TFPI (datos no mostrados).

Ejemplo 11

Este ejemplo demuestra que ARC19499 protege al complejo FXasa extrínseco, que está compuesto por factor tisular, factor VIIa (FVIIa) y factor Xa (FXa), de la inhibición por TFPI en un ensayo de actividad cromogénico con componentes purificados.

Se incubaron factor tisular relipidado (TF; 20 pM), FVIIa (1 nM), vesículas de PCPS (el 75 % de fosfatidilcolina/el 25 % de fosfatidilserina; 20 μ M) y ARC19499 (0-1000 nM) en tampón HBSP2 a 37 °C durante 10 minutos, seguido por la adición simultánea de FX (1 μ M) y TFPI (2,5 nM). Se retiraron alícuotas cada 30 segundos durante 5 minutos y se extinguieron en tampón HBS que contenía EDTA 20 mM y PEG al 0,1 %. Se añadió sustrato Spectrozyme FXa (200 μ M), se midió la velocidad de hidrólisis del sustrato, y se estimó la concentración de FXa activa a partir de una curva de calibración. Concentraciones crecientes de ARC19499 provocaron un aumento en la actividad de FXa (figura 24) de hasta el 70 % de la velocidad medida en ausencia de TFPI, demostrando que ARC19499 protegió sustancialmente al complejo FXasa extrínseco de la inhibición por TFPI.

Ejemplo 12

Este ejemplo demuestra que ARC19499 protege al complejo factor tisular:FVIIa de la inhibición de TFPI en un ensayo fluorogénico de la actividad del factor tisular: FVIIa llevado a cabo con componentes purificados.

Se incubaron factor tisular (TF; 1 nM), FVIIa (2 nM) y ARC19499 (0-7,5 nM) en HBSP2 a 37 °C durante 10 minutos, seguido por la adición simultánea de un sustrato fluorogénico SN-17c (50 μ M) y TFPI (8 nM). Se midió la velocidad de hidrólisis del sustrato en un lector de placas fluorescente (BioTek). TFPI inhibió aproximadamente el 50 % de la actividad de TF:FVIIa en estas condiciones (figura 25). La adición de una concentración estequiométrica de ARC19499 (8 nM) restableció completamente toda la actividad de TF:FVIIa en comparación con un control sin TFPI (figura 25), demostrando que ARC19499 protegió eficazmente al complejo TF:FVIIa de la inhibición de TFPI. Una titulación de concentraciones crecientes de ARC19499 en presencia de TFPI 8 nM aumentó la actividad del complejo TF:FVIIa de manera dependiente de la concentración de ARC19499, alcanzando el punto medio de actividad a ARC19499 ~1 nM. El análisis de los datos indicó que la K_D aparente de ARC19499 para TFPI en este ensayo era de 1,2 nM. ARC19499 es específico para TFPI y no inhibió la actividad de TF:FVIIa en ausencia de TFPI (datos no mostrados).

Ejemplo 13

Este ejemplo demuestra que ARC19499 inhibe TFPI en un proteoma de coagulación sintético que modela la hemofilia A y hemofilia B. Estos datos muestran que ARC19499 restableció la generación normal de trombina en presencia de factor VIII (FVIII) completo (el 0 %) o deficiencia de factor IX (FIX). ARC19499 también restableció la generación normal de trombina en presencia de deficiencia de FVIII incompleta (el 2 %, el 5 % o el 40 %).

Se inició la generación de trombina con factor tisular relipidado 5 pM (TF) añadido a una mezcla de procoagulantes e inhibidores de la coagulación (factores V, VII, VIIa, VIII, IX, X, XI, protrombina, antitrombina y TFPI; todos a concentraciones fisiológicas medias) y PCPS 50 μ M (el 75 % de fosfatidilcolina/el 25 % de fosfatidilserina). Se midió

la generación de trombina a lo largo del tiempo en un ensayo cromogénico usando el sustrato Spectrozyme TH (American Diagnostica). Se sometió a prueba ARC19499 a concentraciones crecientes de 1 nM, 2,5 nM, 5 nM y 10 nM en un sistema totalmente reconstituido (control sano) o en sistemas reconstituidos en los que se omitió o bien FVIII (hemofilia A grave) o bien FIX (hemofilia B grave).

En presencia de todas las proteínas a todas sus concentraciones fisiológicas medias ("control sano"; figura 26), la fase de iniciación (demora) de generación de trombina iniciada con TF relipidado 5 pM era de aproximadamente de 6 minutos, y la concentración máxima de trombina activa observada era de 270 nM (rombos rellenos). La omisión de TFPI acortó significativamente la fase de iniciación (hasta 2 minutos) y aumentó la concentración de trombina máxima hasta 374 nM (círculos rellenos). Adiciones de concentraciones crecientes de ARC19499 en presencia de TFPI 2,5 nM disminuyeron la duración de la fase de iniciación y aumentaron la concentración de trombina máxima de manera dependiente de ARC19499, y a 10 nM (cuadrados en blanco) el perfil de generación de trombina de ARC19499 era prácticamente idéntico al observado en ausencia tanto de TFPI como de ARC19499 (figura 26).

En ausencia de FVIII, la generación de trombina iniciada por TF se suprimió significativamente (figura 27). La fase de iniciación se amplió desde 6 minutos en el "control sano" (rombos rellenos) hasta 10 minutos en hemofilia A (rombos en blanco), y la actividad de trombina máxima disminuyó desde 270 nM hasta 34 nM. La omisión de TFPI en ausencia de FVIII restableció la generación normal de trombina (la concentración máxima de trombina activa aumenta hasta 264 nM) y la duración de la fase de iniciación disminuyó hasta 2 minutos (círculos rellenos). En ausencia de FVIII y en presencia de TFPI 2,5 nM, la adición de ARC19499 5 nM (asteriscos) restableció la generación de trombina hasta el nivel observado en el "control sano" con la fase de iniciación de 3 minutos. En presencia de ARC19499 10 nM (cuadrados en blanco) y TFPI 2,5 nM y en ausencia de FVIII, la generación del perfil de trombina se volvió similar al observado en ausencia de TFPI, FVIII y ARC19499.

El efecto de inhibición de TFPI por ARC19499 en un proteoma de coagulación sintético de hemofilia B (sin FIX) era similar al observado para el modelo de hemofilia A, es decir, ARC19499 a una concentración 5 nM y en ausencia de FIX restableció la generación de trombina hasta el nivel similar al observado en el "control sano" (figura 28).

Se evaluó el efecto de ARC19499 sobre la generación de trombina iniciada por TF en el modelo de proteoma de coagulación sintético con FVIII al 0 %, al 2 % (0,014 nM), al 5 % (0,035 nM), al 40 % (0,28 nM) y el 100 % (0,7 nM). Las concentraciones de FVIII seleccionadas cubrieron el intervalo observado en pacientes con hemofilia A grave (<1 %), moderada (1-5 %) y leve (5-40 %). En ausencia de ARC19499 (figura 29), se suprimió la generación de trombina a todas las concentraciones de FVIII sometidas a prueba, hasta e incluyendo el 40 %. El nivel de trombina pico observado en proteoma con FVIII al 40 % (asteriscos) era aproximadamente el 50 % del "control sano" (rombos rellenos). La adición de ARC19499 a una concentración de 1 nM era suficiente para aumentar significativamente la generación de trombina acortando la fase de iniciación y aumentando los niveles trombina pico (figura 30). La adición de ARC19499 2,5 nM normalizó esencialmente la generación de trombina en presencia de FVIII al 0-5 % (figura 31), mientras que con FVIII al 40 % y al 100 %, ARC19499 2,5 nM indujo un acortamiento adicional de la fase de iniciación y aumentó la trombina pico, casi al grado del control "sin TFPI".

La figura 32 muestra datos de proteoma de coagulación sintético adicionales para FVIII al 0 % en presencia de una serie de concentraciones de ARC19499 (0, 1, 2,5, y 10 nM) en comparación con un "control sano" y un control "sin TFPI". La figura 33 muestra los datos para FVIII al 100 % para el mismo intervalo de concentraciones de ARC19499. Las figuras 34, 35 y 36 muestran los datos para FVIII al 2 %, al 5 % y al 40 % en presencia de ARC19499 0, 1 y 2,5 nM, respectivamente. En todas las condiciones, ARC19499 mostró una respuesta procoagulante significativa, provocando que disminuyera la fase de iniciación (tiempo de demora) y que aumentara la trombina pico. En todos los casos de deficiencia de FVIII (FVIII al 0-40 %), ARC19499 fue capaz de restablecer un perfil de generación de trombina normal.

Ejemplo 14

Este ejemplo demuestra que la actividad *in vitro* de ARC19499 es específica para la presencia de TFPI.

En este experimento, se sometió a prueba la capacidad de ARC19499 para afectar a la generación de trombina en el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT), que mide la generación de trombina a lo largo del tiempo tras la iniciación de la ruta de coagulación del factor tisular, en tres condiciones de plasma diferentes. En la primera condición, se añadieron concentraciones crecientes de ARC19499 a plasma normal mezclado (PNP) y se mezclaron con una disolución que contenía factor tisular (TF) y fosfolípidos de manera que la concentración de TF era o bien de 0,1 o bien de 1,0 pM en el volumen de reacción final (figura 37). Se inició la generación de trombina mediante la adición de una mezcla que contenía cloruro de calcio y un sustrato fluorogénico para trombina. La reacción tuvo lugar a 37 °C, y se midió periódicamente la intensidad de fluorescencia durante 1 hora. Se sometió a prueba ARC19499 a las siguientes concentraciones en el plasma: 0,1, 1, 10, 100 y 1000 nM.

Con cualquier concentración de TF, el aumento de ARC19499 aumentó la generación de trombina en plasma PNP (figura 37A-B). Tanto los valores de potencial de trombina endógeno (ETP - área bajo la curva) como los de trombina pico (nivel más alto de trombina producida en un punto cualquiera en el ensayo) aumentaron de manera

dependiente de la dosis con ARC19499 (figura 37C-D). El tiempo de demora (tiempo que tarda en empezar la generación de trombina) disminuyó de manera dependiente de la dosis con ARC19499 (figura 37E). Estos resultados se observaron a ambas concentraciones de TF.

5 Se repitió el ensayo de CAT que mide la actividad de ARC19499 en plasma empobrecido en TFPI. El plasma que se inmunoempobreció para TFPI y se liofilizó, se obtuvo de American Diagnostica (Stamford, CT) y se resuspendió antes del uso. Se midió la generación de trombina tal como se describió anteriormente con TF 0,01, 0,1 o 1,0 pM. Los resultados en la figura 38A muestran que las curvas de generación de trombina medidas para cada
10 concentración de TF eran distintas entre sí, pero dentro de una concentración específica de TF no hubo esencialmente diferencia en la generación de trombina a medida que se aumentaba la concentración de ARC19499. Esto también se observó en los parámetros medidos en el ensayo de CAT. Hubo poco o ningún cambio en ETP, trombina pico o tiempo de demora a medida que aumentó la concentración de ARC19499 (figura 38B-D), independientemente de la concentración de TF.

15 Se sometió a prueba la actividad de ARC19499 en un tercer conjunto de condiciones de plasma. En este caso, se incubó PNP con un anticuerpo policlonal contra TFPI, con el fin de neutralizar toda la actividad de TFPI. Entonces se añadió ARC19499 a este plasma tratado con anticuerpo (figura 39). De nuevo, se inició la generación de trombina con o bien TF 0,01, 0,1 o bien 1,0 pM. La adición del anticuerpo policlonal potenció la generación de trombina a las tres concentraciones de TF porque el TFPI se neutralizó; sin embargo, concentraciones crecientes de ARC19499
20 parecieron provocar aumentos adicionales en la generación de trombina (figura 39A-C). Hubo de poco a ningún efecto sobre el ETP, trombina pico o tiempo de demora cuando se añadió ARC19499 (figura 39D-F).

Estos experimentos indican que ARC19499 solo tiene actividad procoagulante cuando está presente TFPI funcional en el plasma y, por tanto, ARC19499 es específico para TFPI.

25 Ejemplo 15

Este ejemplo demuestra que ARC17480, ARC19498 y ARC19499 inhiben la actividad de TFPI *in vitro*.

30 En este experimento, se midió la actividad inhibidora de aptámeros frente a TFPI (ARC17480, ARC19498 y ARC19499) *in vitro* en plasma de hemofilia A mezclado (deficiente en factor VIII) en un ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT). Se titularon los aptámeros a diferentes concentraciones en plasma de hemofilia A mezclado, y la cantidad de trombina generada se comparó con un control de plasma normal mezclado (figura 40A-C), usando TF 1,0 pM en la reacción final. Tanto el potencial de trombina endógeno (ETP), que es el área bajo la
35 curva de la generación de trombina frente al tiempo, como la trombina pico, que es la concentración más alta de trombina generada a lo largo del transcurso del experimento, proporcionaron mediciones indirectas de inhibición por aptámero de TFPI. Los tres aptámeros tenían actividad similar en este ensayo, teniendo ARC19499 una actividad ligeramente mayor que los otros dos. ARC19499 corrigió el ETP hasta casi niveles normales en 30 nM (figura 40D). Los niveles de trombina pico también aumentaron con concentraciones crecientes de aptámero (figura 40E).

40 Estos resultados muestran que ARC17480, ARC19498 y ARC19499 inhiben la actividad de TFPI *in vitro*.

Ejemplo 16

45 Este ejemplo demuestra que ARC19499 aumenta la generación de trombina en plasma humano normal tratado con un anticuerpo anti-factor VIII para generar un estado similar a la hemofilia A.

Se trató plasma desplaquetado de un voluntario normal, sano con un anticuerpo anti-FVIII para generar un estado similar a la hemofilia A. La generación de trombina en este plasma tratado con anticuerpo era similar a la observada
50 con plasma de hemofilia A (figura 41). La adición de ARC19499 al plasma tratado con anticuerpo dio como resultado un aumento dependiente de la dosis en la generación de trombina. Estos resultados demuestran que ARC19499 puede corregir la generación de trombina en plasma con bajos niveles de FVIII que resultan del tratamiento con un anticuerpo anti-FVIII.

55 Ejemplo 17

Este ejemplo demuestra que ARC17480 y ARC19499 inhiben la actividad de TFPI *in vitro* y tienen actividad biológica.

60 Se evaluaron los efectos del aptámero inhibidor de TFPI de núcleo no pegilado ARC17480 y el aptámero pegilado ARC19499 para determinar la actividad de generación de trombina *in vitro* en plasma de hemofilia B (deficiente en FIX) usando el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT).

Estos estudios se realizaron en plasma mezclado de dos pacientes con hemofilia B con niveles de factor IX <1 %
65 (comercialmente disponible de George King Bio-Medical, Inc, Overland Park, KS). En este ensayo, plasma y aptámero se mezclaron juntos y se añadieron a un reactivo que contenía fosfolípidos y factor tisular. Se inició la

generación de trombina mediante la adición de una mezcla que contenía cloruro de calcio y un sustrato fluorogénico para trombina. La reacción tuvo lugar a 37 °C, y se midió periódicamente la intensidad de fluorescencia durante 1 hora. Las concentraciones finales de factor tisular y fosfolípidos eran de 1 pM y 4 μM, respectivamente. Se sometieron a prueba los aptámeros a las siguientes concentraciones en el plasma: 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 nM. Se muestran curvas de generación de trombina individuales en la figura 42, que ilustran los efectos de concentraciones crecientes de ARC19499 (figura 42A) o ARC17480 (figura 42B) sobre el grado de generación de trombina en plasma de hemofilia B en comparación con plasma normal mezclado. Se muestran la representación gráfica de ETP, la trombina pico y el tiempo de demora en la figura 43. Se representan gráficamente los resultados con ARC19499 en el lado izquierdo, y se representan gráficamente los resultados con ARC17480 en el lado derecho.

Los niveles de ETP y trombina pico disminuyeron ~85 % y ~95 %, respectivamente, en plasma de la mezcla de hemofilia B en comparación con el plasma normal mezclado, de manera coherente con una deficiencia en la generación de trombina debido a la pérdida de factor IX. Tanto ARC17480 (triángulos) como ARC19499 (rombos) corrigieron en gran medida el defecto en la generación de trombina, tal como se mide mediante estos dos parámetros (figura 43). Para 100 nM, ambos aptámeros demostraron un ETP casi equivalente al logrado con plasma normal mezclado, y una trombina pico casi equivalente en ARC17480 300 nM (figura 43). Se estabilizó la trombina pico mediante ARC19499 300 nM. ARC17480 y ARC19499 disminuyeron el tiempo de demora en plasma de hemofilia B, por debajo de lo que se logró con plasma normal mezclado y plasma de hemofilia B sin ningún fármaco (figura 43).

Estos resultados muestran que ARC17480 y ARC19499 inhiben TFPI con potencia similar en plasma de hemofilia B *in vitro*.

Ejemplo 18

Este ejemplo demuestra que ARC19499 inhibe la actividad de TFPI *in vitro* y tiene actividad biológica en comparación con un aptámero de control negativo.

Se sometió a prueba la capacidad de ARC19499 para potenciar la generación de trombina en tres plasmas desplaquetados de hemofilia: plasma mezclado de 7-8 pacientes con hemofilia A grave (niveles de FVIII <1 %; denominado "plasma de hemofilia A"), plasma de tres pacientes con hemofilia A diferentes con altos títulos de anticuerpos anti-FVIII (≥160 unidades Bethesda (UB)/ml; denominado "plasma con inhibidor"), y plasma mezclado de dos pacientes con hemofilia B grave (niveles de FIX <1 %; denominado "plasma de hemofilia B"). Todos los plasmas eran de George King Bio-Medical (Overland Park, KS). Se midió la generación de trombina usando el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT). En este ensayo, plasma y aptámero se mezclaron juntos y se añadieron a un reactivo que contenía fosfolípidos y factor tisular. Se inició la generación de trombina mediante la adición de una mezcla que contenía cloruro de calcio y un sustrato fluorogénico para trombina. La reacción tuvo lugar a 37 °C, y se midió periódicamente la intensidad de fluorescencia durante 1 hora. Las concentraciones finales de factor tisular y fosfolípidos eran de 1 pM y 4 μM, respectivamente. Se comparó la generación de trombina en presencia de ARC19499 (0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 nM) con aptámero de control negativo (0,1, 1, 10, 100 y 1000 nM). Se muestran los diagramas de ETP, trombina pico y tiempo de demora (media ± EEM) en la figura 44.

El plasma de hemofilia A tenía un tiempo de demora ligeramente más corto y un ETP y trombina pico marcadamente disminuidos (~50 % y ~75 %, respectivamente) en comparación con plasma normal. Las concentraciones crecientes de ARC19499 corrigieron en gran medida el defecto en la generación de trombina. Se corrigió ETP hasta niveles casi normales con ARC19499 3 nM, y se corrigió la trombina pico con aptámero 100 nM (figura 44A). El plasma con inhibidor también tenía ETP y trombina pico disminuidos (~50 % y ~70 %, respectivamente) en comparación con plasma normal. Como con el plasma de hemofilia A grave, ARC19499 aumentó la generación de trombina en este plasma. Con ARC19499 30 nM, tanto el ETP como la trombina pico estaban a niveles normales (figura 44B). La hemofilia B tenía un defecto incluso mayor en la generación de trombina, con ETP y trombina pico significativamente disminuidos (~70 % y ~90 %, respectivamente) y un tiempo de demora aumentado. Como con los plasmas de hemofilia A, las concentraciones crecientes de ARC19499 mejoraron la generación de trombina en este plasma, logrando niveles de ETP normales con ARC19499 30 nM, y niveles de trombina pico normales con aptámero 100-300 nM (figura 44C). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que ARC19499 30-100 nM es eficaz para restablecer la coagulación en tres tipos diferentes de plasma de hemofilia. También se sometió a prueba un aptámero de control negativo en los tres plasmas diferentes y no demostró corrección de generación de trombina (figura 44).

La secuencia del aptámero de control negativo, ARC32603, usada en este ejemplo fue: mG-mG-mA-mA-mUmA-mU-mA-dC-mU-mU-mG-mG-dC-mU-mG-dC-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 152).

Ejemplo 19

Este ejemplo demuestra que ARC17480, ARC26835, ARC19500, ARC19501, ARC31301, ARC18546, ARC19881 y

ARC19882 tienen actividad biológica en el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT).

Se evaluó la actividad inhibidora de TFPI de cada aptámero en el ensayo de CAT en plasma de hemofilia A mezclado a una concentración de aptámero de 500 nM, 167 nM, 55,6 nM, 18,5 nM, 6,17 nM y 2,08 nM. Se incluyó ARC17480 en cada experimento como control. Para cada aptámero, se usaron para el análisis los valores de potencial de trombina endógeno (ETP) y trombina pico a cada concentración de aptámero. Se restó el valor de ETP o trombina pico para plasma de hemofilia A solo del valor correspondiente en presencia de aptámero para cada molécula a cada concentración. Entonces, se representaron gráficamente los valores pico y de ETP ajustados en función de la concentración de aptámero y se ajustaron a la ecuación $y = (\text{máx}/(1 + \text{Cl}_{50}/x)) + \text{int}$, donde y = ETP o trombina pico, x = concentración de aptámero, máx = el ETP máximo o trombina pico, e int = la ordenada en el origen, para generar un valor de Cl_{50} tanto para ETP como para la trombina pico. La figura 45A-D y la figura 46A-B muestran gráficos de experimentos de CAT con ARC17480, ARC26835, ARC19500, ARC19501, ARC31301, ARC18546, ARC19881 y ARC19882. Se muestran tanto el potencial de trombina endógeno ajustado (ETP) como la trombina pico. Estos experimentos demuestran que ARC17480, ARC26835, ARC19500, ARC19501, ARC31301, ARC18546, ARC19881 y ARC19882 inhibieron todos funcionalmente TFPI en el ensayo de CAT, tal como se evidenció por un aumento dependiente de la concentración tanto en ETP como en la trombina pico en plasma de hemofilia A. Todas estas moléculas tienen actividad similar en el ensayo de CAT.

Ejemplo 20

Este ejemplo demuestra que los aptámeros frente a TFPI tienen actividad biológica.

En este experimento, se sometió a prueba la capacidad de ARC19499 para afectar a la generación de trombina en comparación con la de NovoSeven[®] usando el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT). El ensayo de CAT genera varios parámetros para comparar la generación de trombina. El tiempo de demora es una medida de la longitud del tiempo que se requiere para que empiece la generación de trombina. La trombina pico es una medida de la cantidad más alta de trombina que va a generarse en un punto cualquiera. El potencial de trombina endógeno (ETP) es el área bajo la curva de la generación de trombina.

Estos estudios se realizaron en presencia de tres plasmas diferentes: plasma desplaquetado de voluntarios sanos, una mezcla de plasma de pacientes con hemofilia A con niveles de factor VIII <1 % (comercialmente disponible de George King Bio-Medical, Inc, Overland Park, KS), y plasma de pacientes con hemofilia A con un alto título de anticuerpo inhibidor con respecto al factor VIII (comercialmente disponible de George King Bio-Medical, Inc, Overland Park, KS). En el ensayo de CAT, plasma y fármaco (o bien ARC19499 o bien NovoSeven[®]) se mezclaron juntos y se añadieron a un reactivo que contenía fosfolípidos y factor tisular. Se inició la generación de trombina mediante la adición de una mezcla que contenía cloruro de calcio y un sustrato fluorogénico para trombina. La reacción tuvo lugar a 37 °C, y se midió periódicamente la intensidad de fluorescencia durante 1 hora. Las concentraciones finales de factor tisular y fosfolípidos eran de 1 pM y 4 μM, respectivamente. Los fármacos se sometieron a prueba a las siguientes concentraciones en el plasma: 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 nM.

En el plasma de voluntarios sanos, no hubo cambio en el ETP durante el intervalo de concentraciones sometidas a prueba tanto con ARC19499 como con NovoSeven[®] (figura 47A). Los niveles de trombina pico aumentaron ligeramente a dosis mayores, comportándose ARC19499 y NovoSeven[®] de manera prácticamente idéntica (figura 47B). ARC19499 no tenía efecto sobre el tiempo de demora de generación de trombina, mientras que NovoSeven[®] demostró una disminución dependiente de la dosis en tiempo de demora, alcanzando un tiempo mínimo de demora en 30 nM (figura 47C).

Los niveles de ETP y trombina pico disminuyeron ~40 % y ~75 %, respectivamente, en plasma de la mezcla de hemofilia A, lo que es coherente con una deficiencia en la generación de trombina debido a la pérdida de factor VIII. ARC19499 y NovoSeven[®] en gran medida corrigieron el defecto en la generación de trombina, tal como se mide mediante estos dos parámetros. Estos agentes demostraron un efecto casi equivalente sobre ETP, alcanzando un ETP máximo en 30 nM (figura 48A). NovoSeven[®] tuvo un efecto ligeramente mayor sobre la trombina pico alcanzando un nivel máximo en 30 nM. ARC19499 alcanzó el mismo nivel de trombina pico en 300 nM (figura 48B). Tal como se observa en el plasma de voluntarios sanos, ARC19499 no tuvo efecto sobre el tiempo de demora, mientras que NovoSeven[®] mostró una disminución dependiente de la dosis en el tiempo de demora, alcanzando un efecto máximo en 30 nM (figura 48C).

Se observaron resultados similares en el plasma de pacientes con un anticuerpo de alto título. Ambos fármacos aumentaron el ETP y la trombina pico de la misma manera (figuras 49A-B). De nuevo, ARC19499 no tuvo efecto sobre el tiempo de demora, mientras que NovoSeven[®] mostró una disminución dependiente de la dosis del tiempo de demora (figura 49C). El error estándar asociado con el inhibidor de plasma fue mayor que el observado en la mezcla de plasma sano o de hemofilia A. Esto se debió, lo más probablemente, a la diferencia en los títulos entre los tres pacientes con inhibidor (160 UB/ml, 533 UB/ml y 584 UB/ml).

En general, con la excepción del tiempo de demora, ARC19499 y NovoSeven[®] tuvieron efectos muy comparables sobre la generación de trombina en todos los plasmas sometidos a prueba.

Ejemplo 21

Este ejemplo demuestra que los aptámeros frente a TFPI tienen actividad biológica.

En este experimento, se sometió a prueba la capacidad de ARC19499 para afectar a la formación de coágulo en comparación con la de NovoSeven[®] usando el ensayo de tromboelastografía (TEG[®]). El ensayo TEG[®] mide las propiedades mecánicas de un coágulo en desarrollo. En el ensayo TEG[®], una cubeta que contiene el producto sanguíneo y cualquier activador, oscila libremente alrededor de un pistón que está unido a un hilo de torsión. Según se desarrolla el coágulo, hebras de fibrina recién formadas conectan la cubeta oscilante con el pistón estacionario y empiezan a tirar del pistón, generando así una fuerza sobre el hilo de torsión. Esta fuerza se convierte en una señal mediante el ordenador para monitorizar la formación de coágulo, y se presenta visualmente como trazado de la altura de la señal frente al tiempo. A partir de este trazado, pueden extraerse varios parámetros para medir diversos aspectos de la formación de coágulo. El valor de R mide el tiempo que se requiere para que se desarrolle un coágulo inicial. El ángulo es una medida de la velocidad a la que se forma el coágulo. La amplitud máxima (MA) es una medida de la resistencia del coágulo y la estabilidad.

Estos estudios se realizaron en sangre completa con citrato de voluntarios sanos. En el primer ensayo, los fármacos se sometieron a prueba en sangre completa no tratada. En el segundo ensayo, la sangre se trató en primer lugar con un anticuerpo policlonal de oveja contra factor VIII humano durante tres horas a 37 °C antes de la adición de fármaco. En ambos ensayos, se añadieron NovoSeven[®] o ARC19499 a la sangre (tratada o no con anticuerpo) a concentraciones de sangre finales de 0,01, 0,1, 1, 10 o 100 nM. La activación de la coagulación se produjo tras la adición de factor tisular (Innovin) a una dilución final de 1:200000 (□6 fM) y cloruro de calcio a una concentración final de 11 mM.

En sangre no tratada, tanto ARC19499 como NovoSeven[®] demostraron una disminución dependiente de la dosis, moderada en el valor de R que parecía alcanzar un valor mínimo en 10 nM. (figura 50A). El ángulo y los valores de MA permanecieron sin cambios a lo largo de las concentraciones sometidas a prueba (figura 50B-C).

En la sangre tratada con anticuerpo de factor VIII, ambos fármacos tuvieron efectos similares sobre el valor de R. El valor de R se prolongó en sangre tratada con anticuerpo en comparación con sangre no tratada. Según aumentó la concentración de ARC19499 o NovoSeven[®], el valor de R se restableció al mismo nivel al que estaba en sangre no tratada (figura 51A). El tratamiento con anticuerpo disminuyó la velocidad de formación de coágulo en la sangre, que se notifica como el ángulo. NovoSeven[®] tuvo un fuerte efecto sobre el ángulo, aumentándolo de manera lineal de desde 0,1 hasta 100 nM de NovoSeven[®]. Este aumento superó el ángulo logrado con sangre no tratada. ARC19499 también aumentó el ángulo, pero el valor pareció estabilizarse en 10 nM de aptámero, a un nivel similar al logrado con sangre no tratada (figura 51B). El efecto sobre MA fue mínimo con ambos fármacos, principalmente porque no parece haber una gran diferencia en la MA de sangre completa, con o sin tratamiento con anticuerpo de FVIII. Ambos fármacos dieron como resultado valores de MA que se encontraron entre los logrados con sangre no tratada y los logrados con sangre tratada con anticuerpo (figura 51C).

Tal como se observa en el ensayo de CAT, ARC19499 y NovoSeven[®] tuvieron efectos muy comparables sobre la formación de coágulo en sangre completa, tanto si la sangre carecía de factor VIII o no. La principal diferencia entre los dos fármacos se observó en el efecto sobre la velocidad de formación de coágulo (ángulo), mostrando NovoSeven[®] un aumento más lineal en la velocidad a medida que la concentración aumentaba, aunque ARC19499 también aumentó la velocidad.

Ejemplo 22

Este ejemplo demuestra que los aptámeros frente a TFPI tienen actividad biológica.

En este experimento, se sometió a prueba la sinergia entre ARC19499 y el factor VIII en la generación de trombina usando el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT). Estos estudios se realizaron en presencia de una mezcla de plasma de pacientes con hemofilia A con niveles de factor VIII (FVIII) <1 % (comercialmente disponible de George King Bio-Medical, Inc, Overland Park, KS). Se analizaron concentraciones crecientes de ARC19499 (de desde 1 hasta 300 nM) en presencia de factor VII al 0, el 1,4, el 2,5, el 5, el 14 y el 140 % (Norma internacional de la Organización Mundial de la Salud). Los resultados se compararon con las respuestas del nivel inicial para plasmas de hemofilia A y normales mezclados en ausencia de ARC19499.

Suponiendo que los plasmas normales y de hemofilia A son en cualquier caso equivalentes, la ausencia de factor VIII en el plasma de hemofilia A provocó una disminución marginal en el tiempo de demora del nivel inicial para la generación de trombina en comparación con plasma normal (figura 52A), una disminución de 3-4 veces en la concentración de trombina pico (figura 52B) y una disminución de 1,5-1,6 veces en el potencial de trombina endógeno (ETP) (figura 52C) en este experimento. En ausencia de factor VIII, ARC19499 tuvo poco o ningún efecto sobre el tiempo de demora para la generación de trombina, pero provocó un aumento dependiente de la dosis en la concentración de trombina pico y ETP. La adición de factor VIII exógeno provocó cambios incrementales en todos

los parámetros, observándose los mayores efectos sobre la concentración de trombina pico (figura 52B). La reconstitución con factor VIII al 140 % restableció este parámetro hasta un nivel similar al observado en plasma normal, con mejoras más pequeñas observadas con factor VIII al 14 % e inferior. Además, el aumento incremental en la trombina pico provocado por cada concentración de factor VIII fue prácticamente idéntico en todas las concentraciones de ARC19499, lo que sugiere que los efectos de los dos agentes sobre la generación de trombina son aditivos en lugar de sinérgicos. Con ETP, el factor VIII aplanó la curva de respuesta a la dosis de ARC19499 observándose un efecto aditivo solo a las concentraciones menores de ARC19499 (figura 52C). Una vez que se alcanzó 10 nM de ARC19499, el factor VIII adicional no parecía tener un beneficio. La figura 53A muestra el ETP de plasma de hemofilia A con diferentes concentraciones de FVIII añadido (líneas discontinuas). La adición de ARC19499 dio como resultado un aumento dependiente de la dosis en la generación de trombina en plasma de hemofilia A y en plasma de hemofilia A con FVIII al 5 % añadido. ARC19499 medió un efecto procoagulante en plasma de hemofilia A que fue similar a FVIII al 14 % a 1-10 nM de aptámero cuando se evaluó ETP (figura 53A) o 10-30 nM cuando se evaluó la trombina pico. Cuando se añadió una cantidad de saturación de ARC19499 (300 nM) a plasma con diferentes concentraciones de FVIII, los niveles de generación de trombina eran próximos a los observados con plasma normal, lo que indica que ARC19499 no tiene un efecto protrombótico grave (figura 53B). Incluso con factor VIII al 140 %, nunca se alcanzaron los niveles de ETP de plasma normal. Con esta medida, por tanto, la adición de factor VIII exógeno pareció obviar la necesidad de un contrainhibidor como ARC19499, en lugar de facilitar su acción. De manera interesante, ARC19499 pareció disminuir el tiempo de demora a las mayores concentraciones de factor VIII (figura 52A).

La inhibición de TFPI en este caso puede permitir una propagación más rápida, dependiente del factor VIII de la generación de trombina.

Ejemplo 23

Este ejemplo demuestra que ARC19499 puede mejorar la coagulación en un modelo espacial de formación de coágulo, en plasma de hemofilia activado con factor tisular inmovilizado.

La propiedad clave del modelo experimental espacial es que la coagulación de plasma sanguíneo se activa mediante una superficie cubierta con factor tisular inmovilizado (TF). Entonces, el gel de fibrina se propaga en la mayor parte del plasma. La coagulación tiene lugar en una cámara especialmente diseñada (figura 54A). Las muestras de plasma se cargan en el pocillo de la cámara que se coloca posteriormente en el termostato. Todos los experimentos se realizan a 37 °C. La coagulación se inicia mediante la inmersión de un inserto con TF inmovilizado sobre su cara terminal en la cámara. Se registra la formación de coágulo mediante dispersión de la luz a partir del gel de fibrina usando una cámara CCD (figura 54B). La cámara se ilumina uniformemente con luz monocromática y se capturan imágenes cada 15 segundos. Entonces, el ordenador procesa la serie de imágenes adquirida y se calculan los parámetros de la dinámica espacial de la coagulación sanguínea.

Para los propósitos de este conjunto de experimentos, se derivatizaron superficies con densidades de TF en el intervalo de 1-100 pmoles/m². Se caracterizó la densidad de TF sobre la superficie por la capacidad para activar el factor X (Enzyme Research Laboratories) en presencia de factor VIIa en exceso (Novoseven[®]; Novo Nordisk) usando un sustrato de factor Xa cromogénico S-2765 (Chromogenix). Se midió la velocidad de escisión de S-2765 mediante absorción de luz (405 nm) y en comparación con una curva de calibración preparada usando un conjunto de disoluciones patrón de TF (American Diagnostica) para calcular la concentración de TF.

Se procesó cada imagen de dispersión de la luz calculando la intensidad de dispersión de la luz media (basándose en la intensidad de pixel) a lo largo de una línea perpendicular extraída para activar la superficie. Los datos de cada imagen se representaron como una única línea de contorno en una representación gráfica de intensidad de dispersión de la luz frente a la distancia de la superficie de activación (figura 55). Se representó la propagación de coágulos cualitativamente mediante líneas de contorno sucesivas de intensidad de dispersión de la luz creciente, determinada a partir de imágenes tomadas en puntos de tiempo consecutivos de hasta 90 minutos (figura 55), o cuantitativamente, representando gráficamente el tamaño del coágulo frente al tiempo (figura 56). Se determinó el tamaño del coágulo para cada imagen como la coordenada (en micrómetros o milímetros) a lo largo de la línea de contorno en la que la intensidad de dispersión es la mitad de la máxima. Basándose en representaciones gráficas del tamaño del coágulo frente al tiempo, se calcularon los siguientes parámetros: tiempo de demora (retraso entre el contacto del plasma con un activador y comienzo de la formación de coágulo), velocidad inicial de crecimiento de coágulo (α o V_{inicial} ; pendiente media del tamaño de la curva de coágulo frente al tiempo durante los primeros 10 minutos tras el tiempo de demora), velocidad espacial o estacionaria de crecimiento de coágulo (β o $V_{\text{estacionaria}}$; pendiente media durante los siguientes 30 minutos) y el tamaño del coágulo tras 60 minutos del experimento (un parámetro integral de la eficacia de formación de coágulos). Para cada experimento, se extrajeron cuatro líneas perpendiculares de diferentes puntos a lo largo de la superficie de activación. Se analizaron perfiles de tamaño del coágulo frente al tiempo y se obtuvieron cuatro valores de cada parámetro de coagulación y entonces se realizó el promedio para obtener medias.

Este estudio se llevó a cabo usando principalmente plasma recién preparado (en lugar de plasma comercial o congelado) de donantes normales y pacientes con hemofilia A. Se recogió sangre de voluntarios sanos y pacientes

con hemofilia A a una razón 9:1 v/v en una disolución que contenía citrato de sodio al 3,8 % más CTI 0,2 mg/ml (Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences), luego se procesó mediante centrifugación a 1.500 g durante 15 minutos para obtener plasma desplaquetado. Se centrifugó adicionalmente a 10.000 g durante 5 minutos para obtener plasma libre de plaquetas. Se prepararon mezclas nuevas de plasma normal de 3 donantes sanos cada una. Quince minutos antes de un experimento, se complementaron 300 μ l de plasma con 18 μ l de ARC19499 o factor VIIa recombinante (denominado alternativamente Vllar o Novoseven®). En experimentos de control que carecían de ARC19499 o factor Vllar, se complementó el plasma con el mismo volumen de solución salina tamponada con fosfato. Se recalcificó el plasma mediante la adición de 6 μ l de CaCl_2 1 M, se mezcló, y se colocaron 300 μ l de plasma recalcificado en la cámara experimental. Entonces se colocó el inserto con la superficie derivatizada con TF en la cámara para iniciar la coagulación (figura 54A).

El resultado de un experimento de formación espacial de coágulo típico, activado por 1 pmol/m² de densidad de TF en plasma mezclado normal, sin y con 300 nM de ARC19499 se muestra en las figuras 55A y B, respectivamente. Las representaciones gráficas muestran contornos de dispersión de la luz en función de la distancia del activador. El tiempo entre dos contornos es de 2,5 minutos y el tiempo total de cada experimento es de 90 minutos. El potenciamiento en la dispersión de la luz en cada punto de tiempo en la figura 55B en comparación con la figura 55A indica que la adición de ARC19499 mejoró la formación espacial de coágulo. Sin embargo, los efectos de ARC19499 sobre la formación de coágulo se observan más claramente en una representación gráfica del tamaño del coágulo frente al tiempo (figura 56) derivada de los datos de dispersión procesados, donde se observan mejoras en el tiempo de demora, V_{inicial} (α) y el tamaño del coágulo a los 60 minutos.

Se representaron gráficamente los parámetros de formación de coágulo en función de la superficie de densidad de TF en la figura 57. Las barras de error verticales indican desviaciones estándar (DE) para los parámetros de coágulo mientras que "n" es el número de experimentos realizados a una densidad de TF específica. Las barras horizontales son DE para determinaciones de densidad de TF (n=2 para cada serie de activador). La figura 57A muestra la dependencia del tiempo de demora en promedio con respecto a la densidad de TF activador. La magnitud de la inhibición de TFPI mediante ARC19499 dependió de la densidad de TF y se volvió más significativa según disminuía la densidad (acortamiento de hasta 2,5 veces del tiempo de demora a densidades de TF de 1-3 pmoles/m²). La figura 57B muestra la dependencia de la velocidad de crecimiento de coágulo inicial en promedio con respecto a la densidad de TF activador. De nuevo, el efecto de ARC19499 fue significativo solo a bajas densidades de TF (1-3 pmoles/m²) donde se observó un aumento de $\square$ 1,8 veces de la velocidad inicial. La figura 57C ilustra la dependencia de la velocidad de crecimiento de coágulo estacionaria con respecto a la densidad de TF activador; ARC19499 tuvo poco efecto sobre la velocidad de propagación de coágulos en la totalidad de intervalos de activadores. Finalmente, la figura 57D muestra el tamaño del coágulo en promedio tras 60 minutos. La inhibición de TFPI afectó al tamaño del coágulo a densidades de TF de 1-4 pmoles/m²; los efectos de ARC19499 se volvieron insignificantes según aumentaba la densidad de TF. Basándose en estos datos, se eligieron dos densidades de TF para estudios adicionales de ARC19499: bajas, 1-2 pmoles/m², y medias, 10-20 pmoles/m². Se prepararon varios lotes de activadores para cada una de estas densidades de TF; los valores medios para los activadores de baja y media densidad fueron de $2,0 \pm 0,68$ (n=22 lotes) y $20,6 \pm 8,90$ pmoles/m² (n=5 lotes), respectivamente.

Se evaluó la influencia de diferentes concentraciones de ARC19499 (desde 0 hasta 1000 nM) sobre la coagulación espacial en plasma mezclado normal para examinar la dependencia de la dosis de los efectos de ARC19499. La figura 58 muestra medias y errores estándar de la media (EEM) para experimentos con diferentes mezclas de plasma normal (n=4) y bajas densidades de TF de superficie. El tiempo de demora (figura 58A) disminuyó con la concentración creciente de ARC19499 hasta 30 nM, y luego se estabilizó. La velocidad inicial (figura 58B) aumentó en ~30 % con la concentración creciente de ARC19499, mientras que la velocidad estacionaria (figura 58C) no resultó significativamente afectada en la totalidad de intervalos de concentraciones. Hubo un aumento detectable en el tamaño del coágulo a los 60 minutos (figura 58D) con la concentración creciente de ARC19499. Para todos los parámetros afectados, los efectos máximos de ARC19499 se lograron claramente en 300 nM, y la concentración de la mitad del efecto máximo fue <10 nM. La figura 59 muestra medias ($\pm$ EEM) de parámetros de coagulación para 0 y 300 nM de ARC19499 a baja densidad de TF combinando los datos sin procesar de las figuras 57 y 58 (n=6). Para calcular la significancia estadística del efecto de ARC19499, se calculó la diferencia entre cada valor de parámetro, con y sin ARC19499, para cada experimento, y se comparó la distribución de estas diferencias con cero usando la prueba de la t. Los asteriscos indican significancia estadística ($P < 0,05$), que la diferencia entre valores $\pm$ ARC19499 era diferente de cero. Los efectos en los cuatro parámetros eran estadísticamente significativos, aunque los efectos sobre el tiempo de demora y el tamaño del coágulo fueron los mayores.

La figura 60 muestra parámetros medios ($\pm$ EEM) para experimentos con diferentes mezclas de plasma normal (n=3) y densidades de TF de superficie medias, representados gráficamente en función de la concentración de ARC19499. Los efectos de ARC19499 sobre la coagulación fueron menos sustanciales en este experimento. La figura 61 muestra el análisis estadístico que compara ARC19499 0 y 300 nM para los cuatro parámetros de coagulación. Aunque algunas de las diferencias parecen estadísticamente significativas (indicadas mediante asterisco), los efectos de ARC19499 sobre la coagulación en plasma normal activado mediante densidad de TF media fueron muy pequeños.

Se muestra la formación de coágulos espaciales típica activada por TF de baja densidad en plasma de hemofilia A en la figura 62. Las representaciones gráficas muestran perfiles de dispersión de la luz en función de la distancia del activador para plasma de hemofilia A solo (figura 62A) y plasma de hemofilia A que contiene ARC19499 100 nM (figura 62B) o Vllar 100 nM (figura 62C). En la figura 63 se muestran imágenes de ejemplo de dispersión de la luz de las que se derivaron estos datos, y en la figura 64 se muestra una representación gráfica del tamaño del coágulo frente al tiempo derivado de los datos procesados, con un perfil de plasma normal incluido para su comparación. Basándose en estos datos, ARC19499 mejoró la formación espacial de coágulo acortando el tiempo de demora y aumentando el tamaño del coágulo. Tal como se muestra en la figura 64, ARC19499 100 nM normalizó parcialmente la formación de coágulo, facilitando la propagación de coágulos desde la superficie de activación. En cambio, Vllar 100 nM estimuló una coagulación independiente de TF potente. En lugar de estimular la normalización de la propagación espacial de coágulos desde la superficie de activación, Vllar en esta concentración indujo coagulación en toda la cámara de reacción.

Experimentos adicionales caracterizaron los efectos dependientes de la concentración de ARC19499 en diversos plasmas de pacientes con hemofilia. Se muestra la demografía de la mezcla de pacientes de la que se extraen muestras en la tabla en la figura 65. Todos los pacientes tenían deficiencias de FVIII graves (<1 %) o moderadas (1-5 %). Las figuras 66, 67 y 68 muestran los efectos de ARC19499 y Vllar sobre la formación espacial de coágulo activada mediante TF de baja densidad en plasmas de los pacientes n.º 1, n.º 2 y n.º 3, respectivamente. Las barras de error en adelante indican EEM para n=4 regiones a lo largo del frente de propagación del coágulo de fibrina dentro de un único experimento. Los paneles A y B de estas figuras muestran la dependencia del tiempo de demora con respecto a las concentraciones de ARC19499 y Vllar, respectivamente. El tiempo de demora disminuyó 2 veces con concentraciones crecientes de ARC19499 desde 0 hasta 30 nM, sin cambio adicional significativo en el tiempo de demora a mayores concentraciones de ARC19499. Los paneles C y D de las mismas figuras muestran la dependencia de la velocidad inicial con respecto a las concentraciones de ARC19499 y Vllar, respectivamente. La velocidad inicial aumentó 2 veces con concentraciones crecientes de ARC19499 desde 0 hasta 30 nM, sin cambio adicional significativo a mayores concentraciones de ARC19499. La figura 69 muestra dependencia de la velocidad de crecimiento de coágulo estacionaria con respecto a las concentraciones de ARC19499 y Vllar para los 3 pacientes en un gráfico. ARC19499 no tuvo efecto sobre la velocidad estacionaria en todo el intervalo investigado de concentraciones, mientras que la adición de Vllar condujo a un fuerte aumento de este parámetro. Finalmente, la figura 70 muestra la dependencia del tamaño del coágulo a los 60 minutos en ARC19499 (figura 70A) y Vllar (figura 70B). El tamaño del coágulo a los 60 minutos aumentó 1,5-2 veces con concentraciones crecientes de ARC19499 desde 0 hasta 30 nM, sin cambio adicional significativo a mayores concentraciones de ARC19499. Se muestra un análisis estadístico de los datos de baja densidad de TF, que compara cada parámetro para ARC19499 0 y 300 nM, en la figura 71. ARC19499 tuvo efectos significativos sobre el tiempo de demora (figura 71A), la velocidad inicial (figura 71B) y el tamaño del coágulo a los 60 minutos (figura 71D), pero no tuvo efecto sobre la velocidad estacionaria (figura 71C).

Las figuras 72, 73 y 74 muestran los efectos de ARC19499 y Vllar sobre la formación espacial de coágulo activada mediante TF de densidad media en plasmas de los pacientes n.º 4, n.º 5 y n.º 6, respectivamente. ARC19499 tuvo poco efecto sobre los parámetros de coagulación para el activador de densidad media en todo el intervalo de concentraciones sometidas a prueba. Se muestra un análisis estadístico de los datos de densidad de TF media que compara cada parámetro para ARC19499 0 y 300 nM en la figura 75. ARC19499 no tuvo efecto significativo sobre ninguno de los cuatro parámetros de coagulación en estas condiciones.

Para estimar el grado de normalización de la coagulación mediante ARC19499 en condiciones de baja densidad de TF, la figura 76 muestra los parámetros medios de la coagulación para la hemofilia A y la hemofilia A con 300 nM de ARC19499 en comparación con plasma normal. ARC19499 acortó el tiempo de demora por debajo del nivel normal y normalizó la velocidad inicial, pero no tuvo efecto sobre la velocidad estacionaria. ARC19499 aumentó el tamaño del coágulo a los 60 minutos en aproximadamente 2 veces desde el 30 % hasta el 60 % del valor normal. Con el fin de comprobar si los efectos de ARC19499 difieren en plasma normal y de hemofilia A, las razones con y sin 300 nM de ARC19499 se representaron gráficamente para los cuatro parámetros de coagulación [razón=(Parámetro)_{+ARC19499} / (Parámetro)_{-ARC19499}] (figura 77). Tanto en plasma de hemofilia A como normal, la razón de tiempo de demora fue $\approx 0,5$, lo que indica que la adición de ARC19499 300 nM disminuyó el tiempo de demora en aproximadamente la mitad en cada uno. Las razones para $V_{\text{estacionaria}}$ también fueron similares entre plasmas. Sin embargo, se observaron razones mayores para V_{inicial} y tiempo de formación de coágulo a los 60 minutos en plasma de hemofilia A en comparación con plasma normal, lo que sugiere que el efecto máximo de ARC19499 en plasma de hemofilia A superó ligeramente el de en plasma normal.

Para determinar una CI_{50} para ARC19499 en plasma de hemofilia A, se representaron gráficamente el tiempo de demora y el tamaño del coágulo medios en función de la concentración de ARC19499 (hasta 10 nM) para baja densidad de TF (figura 78). El efecto semimáximo, calculado mediante ajuste de la curva, era $\approx 0,7$ nM para ambos parámetros.

La figura 79 compara los parámetros de coagulación para plasma de hemofilia A solo con ARC19499 300 nM o con Vllar 30 nM. La figura 79A-D muestra el tiempo de demora, la velocidad inicial de crecimiento de coágulo, la velocidad estacionaria y el tamaño del coágulo tras 60 minutos, respectivamente. Al contrario que Vllar, ARC19499

aumentó el tamaño del coágulo acortando principalmente el tiempo de demora y aumentando la velocidad inicial; no tuvo efecto sobre la fase de propagación espacial ($V_{\text{estacionaria}}$).

También se realizaron experimentos a baja densidad de TF en plasma empobrecido en TFPI para comprender mejor el mecanismo de acción de ARC19499 y la regulación de coagulación espacial por TFPI. Se adquirió plasma empobrecido en TFPI liofilizado de American Diagnostica, se resuspendió en agua desionizada, y se añadió CTI a 0,2 mg/ml. Se añadió TFPI recombinante (TFPIr; R&D systems) en plasma a la concentración de 0 o 10 nM, con o sin ARC19499 (0 o 300 nM), para la medición de la formación espacial de coágulo en presencia de baja densidad de TF de superficie. La adición de TFPIr aumentó significativamente el tiempo de demora (figura 80) en ausencia de ARC19499, pero no tuvo efecto en presencia de ARC19499 300 nM, lo que sugiere que se inhibió completamente. ARC19499 no tuvo efecto sobre la coagulación en plasma empobrecido en TFPI en ausencia de TFPIr complementario, lo que indica que sus efectos son específicos de TFPI. Ni TFPIr ni ARC19499 tuvieron ningún efecto sobre la velocidad inicial en este experimento.

En conclusión, ARC19499 mejoró significativamente la coagulación en plasma normal y de hemofilia A en el sistema espacialmente heterogéneo a baja densidad de TF ($1-3 \text{ pmoles/m}^2$). El tiempo de demora se acortó, y se aumentaron la velocidad inicial de propagación espacial y el tamaño del coágulo a los 60 minutos mediante ARC19499 hasta 2 veces, con poco efecto sobre la velocidad de propagación espacial lejos del activador. En plasma de hemofilia A, esto dio como resultado una normalización completa del tiempo de demora y los parámetros de velocidad inicial, mientras que el tamaño del coágulo a los 60 minutos se normalizó parcialmente (aumentos desde el 30 % hasta el 60 % de lo normal tras la adición de ARC19499). Con aumentos en la densidad de TF, los efectos del aptámero se volvieron más pequeños y apenas hubo efecto a $\text{TF} > 20 \text{ pmoles/m}^2$. La acción de ARC19499 sobre la coagulación en este experimento a baja densidad de TF era específica de TFPI, puesto que ARC19499 no tuvo efecto sobre la coagulación en plasma deficiente en TFPI.

Ejemplo 24

Este ejemplo demuestra que ARC19499 puede mejorar la coagulación en ensayos de tiempo de formación de coágulo libre de células (plasma) y sangre completa, en muestras recogidas de pacientes con hemofilia A y con hemofilia B.

Se recogieron muestras de sangre (20 ml) de 12 sujetos, incluyendo siete sujetos con hemofilia A grave (sujetos n.º 1, 3, 5, 8, 10, 11 y 12), dos sujetos con hemofilia B grave (n.º 4 y 9) y tres controles sanos (n.º 2, 6 y 7). Se recogió sangre en EDTA 0,5 mM e inhibidor de tripsina de maíz 0,1 mg/ml (CTI; Haematologic Technologies Inc.). Aproximadamente, se usó la mitad de cada muestra para ensayos en sangre completa, mientras que la otra mitad se centrifugó para preparar plasma desplaquetado (PPP).

El tiempo de coagulación activado por TF (TF-ACT) es un ensayo en sangre completa realizado usando el sistema de coagulación de sangre completa Hemochron® Response (International Technidyne Corp.), un sistema comúnmente usado para medir las respuestas del paciente a heparina no fraccionada y protamina. Los ACT convencionales medidos por este instrumento usan tubos que contienen un activador de la ruta de coagulación de "contacto" o "intrínseca" (por ejemplo, Celite o caolín). Sin embargo, para TF-ACT, los tubos diseñados para medir ACT convencionales se aclararon de reactivo de activación por contacto. En su lugar, se añadieron $12 \mu\text{l}$ de CaCl_2 1 M, una cantidad deseada de ARC19499, y $2 \mu\text{l}$ de TF relipidado, recombinante 5 nM (Haematologic Technologies). Tras la adición de 2 ml de sangre completa a esta mezcla, el tiempo de formación de coágulo se midió en el instrumento Hemochron® Response como para ACT convencional. Los resultados se muestran en formato tabular en la figura 81. Se observó un TF-ACT de nivel inicial promedio de 335 ± 22 segundos en sujetos normales. Se observaron disminuciones moderadas en TF-ACT (hasta 75 segundos), indicadoras de un efecto procoagulante, en estos individuos para concentraciones de ARC19499 que oscilaban entre 44 y 700 nM. Los dos sujetos con hemofilia B mostraron TF-ACT de nivel inicial de 528 y 580 segundos. El TF-ACT disminuyó en 160-205 segundos a ARC19499 88 nM en estos dos individuos, luego aumentó moderadamente a mayores concentraciones de ARC19499 (hasta 350 nM). Se observó un intervalo relativamente amplio de valores de TF-ACT de nivel inicial en el grupo de hemofilia A, con un valor promedio de 578 ± 140 segundos. Se observó acortamiento sustancial dependiente de ARC19499 del TF-ACT en 6 de 7 de estos individuos, y en dos de estos (sujetos n.º 1 y 11) se observaron valores en el intervalo normal o inferior. Solo se observó una disminución moderada de hasta 47 segundos en el sujeto n.º 12, este sujeto también presentó el TF-ACT de nivel inicial más corto (328 segundos) del grupo. Estos datos sugieren que la supresión de TFPI por ARC19499 era capaz de modular la actividad de coagulación en un ensayo de coagulación de sangre completa sencillo.

Se realizaron ensayos de tiempo de protrombina con dilución (dPT) en PPP preparado a partir de las mismas muestras de sangre tal como se describe para los ensayos de TF-ACT. El tiempo de protrombina convencional (PT) se realiza añadiendo tromboplastina, que consiste en factor tisular ($\sim 1 \text{ nM}$), cloruro de calcio y fosfolípidos, a plasma para evaluar la integridad de la ruta de coagulación de "factor tisular" o "extrínseca". El tiempo de formación de coágulo en una muestra de plasma normal medido usando el protocolo de PT convencional es normalmente de ~ 11 segundos. El PT se usa comúnmente para medir respuestas del paciente a warfarina, y es en gran medida

insensible a deficiencias en factores de la ruta de contacto como FVIII y FIX. Al contrario que el PT convencional, el dPT usa una concentración muy baja de TF y los tiempos de formación de coágulo medidos por este ensayo son sensibles a factores tanto en las rutas de TF como de contacto. En este experimento particular, se diluyó reactivo de tromboplastina (Innovin; Dade-Behring) en solución salina tamponada con tris (tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) para alcanzar una concentración de TF 0,3 pM. El dPT se realizó mezclando 120 μ l de PPP con 60 μ l de la disolución de TF diluida e incubando a 37 °C durante 3 minutos antes de añadir 60 μ l de CaCl_2 25 mM a la mezcla de plasma/TF. Se registró el tiempo de coagulación en un coagulómetro ACL-8000 (de Instrumentation Laboratory, Bedford, MA) y se muestran los datos para todos los sujetos en formato tabular en la figura 82. Los tiempos de formación de coágulo de nivel inicial en muestras de PPP de todos los sujetos normales y con hemofilia B, y 6 de 7 sujetos con hemofilia A eran >360 segundos, que era el tiempo de formación de coágulo máximo medible preestablecido en el coagulómetro. Un sujeto con hemofilia A (n.º 10) presentó un dPT de nivel inicial de 169 segundos. Concentraciones crecientes de ARC19499 añadidas a PPP normalmente dieron como resultado tiempos de formación de coágulo dPT disminuidos. En PPP de sujetos normales, ARC19499 2 nM fue suficiente para reducir significativamente el tiempo de formación de coágulo (promedio = $\pm$ 15 segundos) en relación con el nivel inicial, pero no tuvo efecto aparente en plasma de sujetos con hemofilia A o B. Sin embargo, ARC19499 8 nM redujo el tiempo de formación de coágulo en PPP de prácticamente todos los sujetos. Se observaron excepciones en PPP del sujeto n.º 10, en el que se observó un dPT de nivel inicial bajo, y n.º 12, que parecía no responder a ARC19499. Excluyendo estos dos individuos, el tiempo de formación de coágulo promedio en el grupo de hemofilia A para ARC19499 8 nM fue de $\pm$ 8 segundos. Los tiempos de formación de coágulo promedios para los grupos de sujetos normales y de hemofilia B en las mismas condiciones fueron de $\pm$ 37 segundos y $\pm$ 22 segundos, respectivamente. Mayores concentraciones de ARC19499 solo provocaron disminuciones adicionales moderadas en los tiempos de formación de coágulo. Los tiempos de formación de coágulo promedios a ARC19499 500 nM fueron de $\pm$ 6 segundos, 200 $\pm$ 21 segundos y $\pm$ 3 segundos para los grupos con sujetos normales, de hemofilia A (excluyendo n.º 10 y n.º 12) y de hemofilia B, respectivamente. Estos datos indican que la supresión de TFPI mediante ARC19499 fue capaz de mejorar la actividad de coagulación en un ensayo de coagulación basado en plasma sencillo.

Ejemplo 25

Este ejemplo demuestra que ARC19499 puede mejorar la coagulación en muestras de sangre completa de pacientes con hemofilia A y con hemofilia B, tal como se mide mediante tromboelastometría de rotación (ROTEM).

Se recogieron muestras de sangre de 39 voluntarios sanos (27 hombres y 12 mujeres) y 40 pacientes con hemofilia (todos hombres). De los 40 pacientes con hemofilia, se diagnosticaron 3 pacientes con hemofilia B (HB) y 28 pacientes con hemofilia A (HA) como graves (actividad del factor de nivel inicial <1 %), un paciente con HA y uno con HB padecieron hemofilia moderadamente grave (actividad del factor de nivel inicial 1-5 %), cuatro pacientes con HA y dos con HB presentaron hemofilia leve (actividad del factor de nivel inicial >5 %). Usando una aguja de palomilla del calibre 21, se extrajeron muestras de sangre en tubos Vacuette de plástico (Greiner Bio-One) que contenían citrato de sodio al 3,8 % a una razón en volumen de 1:9.

Se analizó la coagulación mediante ROTEM (Pentapharm GmbH), que se basa en el sistema de tromboelastografía original (TEG™). En un experimento de ROTEM típico, se incubaba sangre a 37 °C en una cubeta calentada. A medida que se forma fibrina entre la cubeta y el pistón, se detecta la impedancia de la rotación del pistón y se genera una traza, lo que indica la formación de coágulo a lo largo del tiempo. Pueden analizarse los siguientes parámetros de la traza de ROTEM: el tiempo de coagulación (CT), el tiempo de formación de coágulo (CFT), la firmeza máxima del coágulo (MCF) y el ángulo alfa (alfa). El tiempo de coagulación (CT) caracteriza el periodo desde el inicio del análisis hasta el inicio del coágulo. El tiempo de formación de coágulo (CFT) describe el posterior periodo hasta que se logra una amplitud de 20 mm. El ángulo alfa viene dado por el ángulo entre la línea central y una tangente a la curva a través del punto de amplitud de 2 mm. Tanto el CFT como el ángulo alfa denotan la velocidad de desarrollo de coágulo. La MCF se calcula a partir de la amplitud máxima de la traza de ROTEM y la estabilidad y resistencia del coágulo; la MCF depende en gran medida del fibrinógeno y la función plaquetaria.

En este conjunto de experimentos, se transfirieron 300 μ l de Sangre completa con adiciones conocidas de ARC19499 (ARC19499 0, 0,2, 0,6, 2, 6, 20, 60, 200 o 600 nM) en cubetas de plástico calentadas previamente. Se recalificaron muestras de sangre usando 20 μ l de CaCl_2 0,2 M y se activó la coagulación por factor tisular (TF) ~33 fM (Innovin, Dade Behring, diluido 1:200.000). Se realizaron todos los análisis a 37 °C. Se realizó la medición o bien sin inhibidor de tripsina de maíz (CTI) o bien con la adición de 100 μ g/ml de CTI (Haematologic Technologies Inc). Se calcularon comparaciones entre diferentes concentraciones de ARC19499 en cualquiera de los parámetros medidos con la prueba de rango con signo de Wilcoxon con una corrección de Bonferroni. Para comparar controles sanos con pacientes, se usó una prueba U de Mann-Whitney. Para analizar la correlación de parámetros hemostáticos con actividad del factor VIII (FVIII), se usó el coeficiente de correlación de rango de Spearman. Un valor de p menor que o igual a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

El perfil de coagulación de sangre completa de nivel inicial de pacientes con hemofilia se caracterizó por una fase de iniciación prolongada (tal como se muestra por un CT prolongado) y una fase de propagación disminuida de coagulación de sangre completa (CFT prolongado y un menor ángulo alfa) en comparación con controles sanos

($p < 0,01$ para todos) en ausencia de CTI (figura 83).

Concentraciones de ARC19499 ≥ 2 nM) potenciaron significativamente la coagulación de sangre completa tanto en pacientes con hemofilia como en controles sanos ($p < 0,01$). El efecto hemostático máximo de ARC19499 se logró con concentraciones ≥ 60 nM. En sangre de hemofilia, ARC19499 disminuyó el CFT y aumentó el ángulo alfa a valores iguales a los de controles sanos ($p > 0,4$). El tiempo de formación de coágulo se mejoró sustancialmente mediante ARC19499, pero no se normalizó completamente. La MCF, aunque no fue significativamente diferente entre los controles y los pacientes, se aumentó significativamente por ARC19499 ($p < 0,05$ para ARC19499 0 nM en comparación con ≥ 2 nM en pacientes con hemofilia y 200 nM en controles sanos).

Una comparación entre los niveles de actividad coagulante de FVIII (FVIII:C) en las muestras de paciente con hemofilia A y CT de nivel inicial indicó una correlación significativa ($p < 0,01$). Por tanto, los datos de paciente con hemofilia A se clasificaron en tres grupos (FVIII:C < 1 %, FVIII:C al 1-5 %, y FVIII:C > 5 %) y se representaron gráficamente junto a los datos de CT de control sano (figura 84). Tal como se indicó previamente, concentraciones de ARC19499 ≥ 2 nM acortaron significativamente el tiempo de coagulación ($p < 0,01$). Los valores de CT para pacientes con hemofilia y controles sanos permanecieron significativamente diferentes ($p < 0,05$), pero ARC19499 acortó el CT de pacientes con hemofilia en un máximo de hasta el 38 %, y los de controles sanos en hasta el 19 %, en comparación con valores de nivel inicial. ARC19499 tuvo el mayor efecto sobre el CT en pacientes con FVIII:C medida < 1 %. Aunque el CT de pacientes con FVIII:C < 1 % no se normalizó completamente, ARC19499 acortó el CT hasta el intervalo de controles sanos y hasta valores iguales a los de pacientes con una FVIII:C > 5 %.

Se realizaron análisis de ROTEM adicionales en sangre que contenía CTI usando muestras de 28 pacientes con hemofilia y 11 controles de hombres sanos. De nuevo, los perfiles de coagulación fueron significativamente diferentes para los pacientes y los controles sanos ($p < 0,01$) para todos los parámetros excepto para la MCF (figura 85). Similar a las mediciones en ausencia de CTI, la adición de ARC19499 a sangre que contiene CTI acortó significativamente el CT y CFT, y elevó el ángulo alfa y la MCF (concentraciones ≥ 20 nM, $p \leq 0,01$). En sangre en contacto con CTI, el efecto prohemostático fue más pronunciado que en sangre sin CTI. Tras la adición de 200 nM de ARC19499 a sangre que contenía CTI, el CT no solo se acortó significativamente ($p < 0,01$) pero ya no era diferente del CT de nivel inicial de controles sanos ($p = 0,06$). ARC19499 también normalizó el CFT y el ángulo alfa en CTI sangre completa, tal como se observó en sangre completa que carecía de CTI. Los parámetros de ROTEM de sangre hemofílica con adiciones conocidas de ≥ 60 nM de ARC19499 fueron iguales a los valores de nivel inicial de controles sanos ($p > 0,1$).

Se incorporó un paciente con hemofilia A adquirida. Este paciente mostró una actividad FVIII:C del 7 %, inhibidor de FVIII 8,5 UB/ml y una aPTT elevada de 63 segundos. Este paciente había recibido dos infusiones de actividad de derivatización de FVIII (FEIBA), la más reciente en el plazo de 8 horas de venopunción. Como consecuencia, el CT y el CFT de este paciente ya eran normales (valores del paciente: CT=496 segundos, CFT=213 segundos; valores medios de control sano: CT=607 segundos, CFT=251 segundos). ARC19499 acortó el CT y el CFT adicionalmente, e incluso más que en controles y pacientes con hemofilia hereditaria (CT: 47 % frente al 19 % y 30 %, CFT: 45 % frente al 38 % y 22 %). ARC19499 también aumentó el ángulo alfa, tal como se muestra en la figura 86.

Puesto que los pacientes con hemofilia A adquirida son extremadamente escasos, el experimento de ROTEM se repitió en sangre normal que se había tratado con un anticuerpo neutralizante para FVIII. Se preincubó sangre de controles sanos con un anticuerpo policlonal anti-FVIII humano de oveja (actividad específica 2300 UB/mg; Haematologic Technologies Inc). La figura 87 muestra el CT (panel de la izquierda) y el CFT (panel de la derecha) en los mismos controles; en el lado izquierdo de cada gráfico, se representan valores tras la inhibición por el anticuerpo frente a FVIII. La adición de ARC19499 60 nM normalizó tanto el CT como el CFT en sangre tratada con anticuerpo.

Estos datos muestran que ARC19499 tuvo un efecto procoagulante sobre la coagulación en muestras de sangre de controles sanos y pacientes con hemofilia, tal como se mide mediante ROTEM. Adicionalmente, ARC19499 fue capaz de normalizar parámetros de coagulación por ROTEM en sangre de pacientes con hemofilia.

Ejemplo 26

Este ejemplo demuestra que ARC19499 puede mejorar la generación de trombina en muestras de plasma de pacientes con hemofilia A y con hemofilia B, tal como se mide mediante trombografía automatizada calibrada (CAT).

Se recogieron muestras de sangre de 39 voluntarios sanos (27 hombres y 12 mujeres) y 40 pacientes con hemofilia (todos hombres). De los 40 pacientes con hemofilia, 3 pacientes con hemofilia B (HB) y 28 pacientes con hemofilia A (HA) se diagnosticaron como graves (actividad del factor de nivel inicial < 1 %), un paciente con HA y uno con HB padecieron hemofilia moderadamente grave (actividad del factor de nivel inicial 1-5 %), y cuatro pacientes con HA y dos con HB presentaron hemofilia leve (actividad del factor de nivel inicial > 5 %). Usando una aguja de palomilla del calibre 21, se extrajeron muestras de sangre en tubos Vacuette de plástico (Greiner Bio-One) que contenían citrato de sodio al 3,8 % a una razón en volumen de 1:9. Se preparó plasma desplaquetado (PPP) a partir de estas muestras por dos etapas de centrifugación a temperatura ambiente, con la primera centrifugación a $1700 \times g$ durante

10 minutos seguido por una segunda centrifugación a $18.000\times g$ durante 15 minutos. Se añadieron adiciones conocidas a PPP que contenía inhibidor de tripsina de maíz 100 $\mu\text{g/ml}$ (CTI; Haematologic Technologies Inc.) de diferentes concentraciones de ARC19499 (ARC19499 0, 0,2, 0,6, 2, 6, 20, 60, 200 o 600 nM) para su uso en el ensayo.

Se realizaron ensayos de CAT añadiendo 80 μl de PPP a 20 μl de una mezcla de factor tisular (TF) y fosfolípidos (PPP-Reagent Low, Thrombinoscope BV) en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las concentraciones finales de TF y fosfolípidos fueron de 1 pM y 4 μM , respectivamente. Se inició la reacción añadiendo 20 μl de sustrato fluorogénico (FluCa Kit, Thrombinoscope BV) y se detectó la fluorescencia usando un fluorómetro Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific). El análisis mediante software de Thrombinoscope dio como resultado curvas de generación de trombina con trombina (nM) en el eje y, y tiempo (minutos) en el eje x. El software determinó valores para varios parámetros incluyendo: tiempo de demora (minutos; tiempo hasta la aparición de la generación de trombina inicial); potencial de trombina endógeno (ETP; nM; área bajo la curva de generación de trombina); trombina pico (nM; la mayor cantidad de trombina generada en un punto cualquiera del ensayo); tiempo hasta el pico (minutos; tiempo hasta alcanzar la concentración de trombina pico); y fin de la producción (minutos; punto de tiempo en el que se alcanza la generación de trombina final). Se calcularon comparaciones entre diferentes concentraciones de ARC19499 en cualquiera de los parámetros medidos con la prueba de rango con signo de Wilcoxon con una corrección de Bonferroni. Para compara controles sanos con pacientes, se usó una prueba U de Mann-Whitney. Un valor de p más pequeño que o igual a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Se muestran ejemplos de datos de CAT en la figura 88 para un paciente con hemofilia A representativo (panel de la izquierda) y un control sano (panel de la derecha), que comparan la generación de trombina en presencia y en ausencia de 200 nM de ARC19499. La adición de ARC19499 normalizó la curva de generación de trombina en la muestra de paciente con hemofilia A y aumentó la generación de trombina en la muestra de control sano.

Se muestran parámetros de CAT promedios para todos los pacientes con hemofilia y controles de hombres sanos en la figura 89. En el nivel inicial, el grupo de pacientes con hemofilia presentó un tiempo prolongado hasta el pico, una menor generación de trombina pico y un ETP gravemente comprometido. En ausencia de ARC19499, los siguientes parámetros de CAT fueron significativamente diferentes entre controles de hombres sanos y pacientes con hemofilia: tiempo hasta el pico, generación de trombina pico, ETP y fin de la producción ($p<0,001$). No hubo diferencia significativa en el tiempo de demora entre controles sanos y pacientes con hemofilia (figura 90). La adición de ARC19499 potenció significativamente todos los parámetros evaluados mediante el ensayo de CAT (figuras 89 y 90). Concentraciones por encima de 60 nM de ARC19499 normalizaron los parámetros de CAT en pacientes con hemofilia. Ya no hubo una diferencia significativa entre los valores de nivel inicial de controles sanos y los valores medidos con adición de ARC19499 ≥ 60 nM en pacientes con hemofilia en los siguientes parámetros de CAT: fin de la producción, tiempo hasta el pico y ETP ($p>0,05$) (figura 89). La trombina pico permaneció significativamente diferente entre pacientes y controles, pero 600 nM de ARC19499 aumentaron la trombina pico en el 185 % en pacientes con hemofilia, desde 47 nM en el nivel inicial hasta 135 nM, alcanzando así el intervalo normal de controles sanos (trombina pico media de controles sanos 167 nM, mínimo 100 nM, máximo 297 nM). ARC19499 acortó el tiempo de demora significativamente en ambos grupos ($p<0,001$ para concentraciones por encima de 0,6 nM) pero las diferencias entre los grupos continuaron sin ser significativas (figura 90).

La figura 91 muestra datos de trombina pico clasificados en tres grupos (actividad coagulante de FVIII (FVIII:C) <1 %, FVIII:C al 1-5 %, y FVIII:C >5 %) y se representaron gráficamente junto a los datos de trombina pico de controles sanos. Concentraciones crecientes de ARC19499 aumentaron la generación de trombina pico en los cuatro grupos. ARC19499 no normalizó completamente la trombina pico en el plasma FVIII:C <1 % en relación con el valor de control sano promedio en el nivel inicial, pero los valores con ARC19499 ≥ 60 nM fueron más altos que los del nivel inicial de pacientes con concentración FVIII:C >5 % y en el intervalo de valores observados para controles sanos (región rayada en la figura 91).

También se realizaron ensayos de CAT en muestras con adiciones conocidas de ARC19499 de un paciente con hemofilia adquirida. Este paciente mostró una actividad de FVIII:C del 7 %, inhibidor de FVIII 8,5 UB/ml y una aPTT elevada de 63 segundos. Este paciente había recibido dos infusiones de actividad de derivatización de FVIII (FEIBA), la más reciente en el plazo de 8 horas de venopunción. Como consecuencia, los parámetros de ROTEM de coagulación en este paciente ya eran normales (valores del paciente: CT=496 segundos, CFT=213 segundos; valores medios de control sano: CT=607 segundos, CFT=251 segundos). Las curvas de generación de trombina medidas en presencia de ARC19499 0, 2, 20 y 200 nM se muestran en la figura 92. Aunque este paciente presentó valores de ROTEM normales, los valores de CAT de nivel inicial estaban gravemente comprometidos. Respecto a los pacientes con hemofilia heredada, concentraciones crecientes de ARC19499 normalizaron la generación de trombina en muestras de este paciente. ARC19499 tuvo la mayor influencia en la trombina pico y el ETP del paciente, ambos de los cuales aumentaron más de 2,5 veces. Se normalizó la trombina pico (trombina pico: nivel inicial 54 nM - máx 165 nM; valor de nivel inicial medio de controles sanos: 164 nM). Además, ARC19499 (200 nM) aumentó el ETP a valores por encima de los de controles sanos (ETP: nivel inicial 973 nM - máx 2577 nM; controles sanos de nivel inicial medios: ETP 1322 nM).

Se repitió el experimento de CAT en plasma normal que se había tratado con un anticuerpo neutralizante para FVIII.

Se preincubó PPP de controles sanos con un anticuerpo policlonal anti-FVIII humano de oveja (actividad específica 2300 UB/mg; Haematologic Technologies Inc). La figura 93 muestra el ETP (panel de la izquierda) y la trombina pico (panel de la derecha) en los mismos controles; en el lado izquierdo de cada gráfico, se representan valores tras la inhibición por el anticuerpo frente a FVIII. La adición de ARC19499 60 nM normalizó tanto el ETP como la trombina pico en plasma tratado con anticuerpo.

Estos datos muestran que ARC19499 tuvo un efecto procoagulante sobre la generación de trombina en muestras de sangre de controles sanos y pacientes con hemofilia, tal como se mide mediante CAT. Adicionalmente, ARC19499 fue capaz de normalizar CAT parámetros en plasma de pacientes con hemofilia.

Ejemplo 27

Este ejemplo demuestra que ARC19499 puede mejorar los tiempos de generación de trombina (TGT) en muestras de plasma de pacientes con hemofilia A grave, moderada y leve, y pacientes con hemofilia B grave, tal como se mide mediante trombograma automatizado calibrado (CAT).

Se recogió sangre en tubos Vacuette de 3,2 ml que contenían citrato de sodio al 3,2 % y 250 µl de inhibidor de tripsina de maíz (CTI) 1,3 mg/ml; la concentración de CTI final fue de 100 µg/ml. Se recogieron muestras de pacientes con hemofilia A grave (FVIII <1 %; n=10), moderada (FVIII al 1-5 %; n=7) y leve (FVIII al 5-40 %; n=5), pacientes con hemofilia B grave (FIX <1 %, n=5) y voluntarios sanos (n=10). Para preparar plasma desplateado (PPP) para ensayos de CAT, se centrifugaron tubos a 2500×g durante 15 minutos, se transfirió el sobrenadante a tubos Eppendorf nuevos, luego se centrifugó de nuevo a 11000×g durante 5 minutos. Se usó el plasma o bien inmediatamente o bien se congeló a -80 °C para su uso posterior. Para analizar los efectos de ARC19499 sobre la generación de trombina, se añadió ARC19499 a plasma a concentraciones de 10, 100, 300, 1000, 3000 o 10.000 ng/ml (0,9, 9,0, 27,1, 90,3, 271 o 903 nM).

Se realizaron ensayos del tiempo de generación de trombina (TGT) mediante trombografía automatizada calibrada (CAT) en un instrumento de Thrombinoscope (Thrombinoscope, Maastricht, Holanda) que consistía en un fluorómetro de microplacas Fluoroskan Ascent de Thermo Scientific (n.º de serie 374-90031C) programado con un software de Thrombinoscope versión 2.6. Se mezclaron 80 µl plasma con 20 µl de factor tisular recombinante relipidado (TF; concentración final 1 pM) y se inició el ensayo mediante la adición de 20 µl de sustrato FluCa. El análisis de los datos mediante un software de Thrombinoscope dio como resultado curvas de generación de trombina con trombina (nM) en el eje y, y tiempo (minutos) en el eje x. El software determinó valores para varios parámetros incluyendo: tiempo de demora (minutos; tiempo hasta la aparición de la generación de trombina inicial), potencial de trombina endógeno (ETP; nM; área bajo la curva de generación de trombina), trombina pico (nM; la cantidad más alta de trombina generada en un punto cualquiera del ensayo) y tiempo hasta el pico (minutos; tiempo hasta alcanzar la concentración de trombina pico). Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Se sometieron a prueba diferencias en las medias de cada grupo usando una prueba de la t de Student o ANOVA, según fuera apropiado.

Las figuras 94-97 muestran datos de CAT representativos de un voluntario sano (HV), un paciente con hemofilia A grave (SHA), un paciente con hemofilia A moderada (MoHA) y un paciente con hemofilia A leve (MiHA). Se muestran datos medios para voluntarios sanos, los tres grupos de paciente con hemofilia A, y el grupo de paciente con hemofilia B en la figura 98 para experimentos realizados en plasma recién procesado. Se disminuyeron los parámetros de ETP de nivel inicial y trombina pico en todos los grupos de paciente con hemofilia en comparación con controles sanos, y se aumentó el tiempo hasta el pico. La gravedad de la deficiencia de FVIII no tuvo efecto sobre la generación de trombina observada, ya que los valores de parámetro de nivel inicial eran esencialmente indistinguibles entre los 3 grupos de paciente con hemofilia A. La deficiencia de FVIII tuvo poco efecto sobre el tiempo de demora del nivel inicial en comparación con controles sanos, pero la deficiencia de FIX dio como resultado prolongación del tiempo de demora en el nivel inicial □□2 veces. Congelar el plasma tuvo poco efecto sobre la generación de trombina ya que similar se observaron valores de parámetros de CAT en muestras de plasma que se habían sometido a congelación-descongelación (figura 99).

Tal como se muestra en las representaciones gráficas de datos individuales (figuras 95-97) y medios (figuras 98 y 99), la adición de ARC19499 mejoró la generación de trombina en plasma de hemofilia. El ETP aumentó con concentraciones crecientes de ARC19499 hasta 10.000 ng/ml (903 nM) alcanzando un nivel normal en todos los grupos de hemofilia (figuras 98 y 99). También se observó una tendencia hacia la mejora en la trombina pico. Aunque no se logró normalización de este parámetro, se observaron mejoras 3-5 veces en todos los grupos de paciente. ARC19499 tuvo poco efecto sobre el tiempo de demora en cualquiera de los grupos de paciente con hemofilia A, pero mejoró ligeramente el tiempo de demora en plasma de hemofilia B. También se observó una ligera mejora en el tiempo hasta el pico en todos los grupos de paciente. En plasma de voluntario sano, la adición de ARC19499 tuvo poco efecto sobre cualquiera de los parámetros de CAT.

Se presentan datos de CAT medianos con intervalos intercuartílicos para plasma nuevo y congelado en las siguientes tablas: tabla 3, hemofilia A grave (SHA); tabla 4, hemofilia A moderada (MoHA); tabla 5, hemofilia A leve (MiHA); tabla 6, hemofilia B grave (SHB); y tabla 7, normal. Tomados en conjunto, los datos muestran que

ARC19499 mejoró la generación de trombina en plasma de paciente con hemofilia A de todos los niveles de gravedad, y en plasma de hemofilia B grave.

Tabla 3: TGT en PPP citrado con CTI-SHA (n=10)

ARC19499 ng/ml	ETP [nM/min]				Pico [nM]			
	Nuevo		Congelado		Nuevo		Congelado	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	1347	1260-1538	1587	1244-1763	88	63-119	107	86-139
3000	1233	1117-1425	1569	1094-1716	76	56-103	103	77-132
1000	1171	1019-1335	1546	1019-1711	71	50-95	90	67-125
300	1078	825-1206	1522	916-1657	60	44-77	83	58-117
100	896	741-1137	1206	726-1469	46	36-76	58	42-94
10	638	564-978	705	516-1169	34	23-48	31	19-62
0	489	292-711	685	247-847	21	13-29	26	10-35

ARC19499 ng/ml	Tiempo de demora [min]				Pico de TT [min]			
	Nuevo		Congelado		Nuevo		Congelado	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	3,3	3,2-4,2	3,5	2,9-3,8	10,1	8,6-12,1	10,6	9,1-13,0
3000	3,3	3,2-3,7	3,5	2,6-4,1	10,1	9,6-11,7	11,5	9,3-13,0
1000	3,3	3,24-3,8	3,6	3,0-3,8	11	9,6-11,7	9,9	9,4-11,4
300	3,4	3,3-3,8	3,7	2,9-4,0	10,1	9,5-12,5	11,3	9,9-11,9
100	3,3	2,5-3,7	3,6	3,0-4,2	10,5	9,3-12,3	11,9	10,8-12,7
10	3,3	3,0-3,5	3,3	2,5-4	10,6	9,3-13,6	11,8	9,2-14,1
0	3,6	3,4-4,3	4,1	3,6-5,7	17,8	16,2-22,9	22,5	15,5-24,8

Tabla 4: TGT en PPP citrado con CTI-MoHA (N=7)

ARC19499 ng/ml	ETP [nM/min]				Pico [nM]			
	Nuevo		Congelado		Nuevo		Congelado	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	1548	1468-1672	1706	1406-2062	102,71	86-134	97	87-133
3000	1498	1331-1538	1637	1188-2054	99,39	68-130	94	88-130
1000	1366	1235-1603	1589	1212-2058	88,92	58-134	86	80-126
300	1314,5	965-1781	1349	1099-1762	81,25	57-90	81	68-108
100	919	835-1792	1085	939-1763	58,77	48-85	74	51-100
10	806	576-1102	796	740-1308	49,19	27-60	47	34-87
0	517,9	384-872	764	392-1105	22,62	16-42	41	16-64

ARC19499 ng/ml	Tiempo de demora [min]				Pico de TT [min]			
	Nuevo		Congelado		Nuevo		Congelado	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	4	3,5-4,8	5,1	4,0-5,6	12,7	10,5-13,6	12,8	11,3-14,7
3000	4,2	4,0-4,8	5	3,3-5,5	12,5	10,3-13,4	12,6	11,3-13,1
1000	4,2	4,8-5,8	5,8	4,6-6,0	12,3	10,5-12,6	12,4	11,3-14,1
300	4,1	3,6-4,3	3,8	3,5-3,3	11,2	10,3-13,3	11,0	9,5-12,2
100	4,2	3,5-4,7	4,8	3,3-5,5	11,0	10,8-13,3	11,5	10-14,1
10	4,5	3,6-4,6	4,6	3,3-6,0	13,7	10,5-14,6	12,2	11,3-14,6
0	4,8	4-5,8,9	5,0	4,2-7	16,4	15-2,3	15,5	13,5-16,8

Tabla 5: TGT en PPP citrado con PPP de HA leve con CTI (n=5)

ARC19499 ng/ml	ETP [nM/min]				Pico [nM]			
	Nuevo		Congelado		Nuevo		Congelado	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	1366	1081-1472	1361	1271-1708	93	75-137	98	87-112
3000	1187	913-1412	1273	1226-1520	87	65-116	81	72-97
1000	1097	871-1398	1245	1156-1330	82	62-102	77	72-88
300	1069	804-1317	1136	1026-1201	78	54-80	69	59-76
100	986	643-1149	1045	753-1145	62	37-77	61	40-67
10	709	421-1000	692	551-1068	42	19-52	39	25-58

0	532	337-823	493	372-800	28	14-37	25	16-41
---	-----	---------	-----	---------	----	-------	----	-------

ARC19499 ng/ml	Tiempo de demora [min]				Pico de TT [min]			
	Nuevo		Congelado		Nuevo		Congelado	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	4	2,4-5,2	3,6	3-5,6	9,6	8-11,5	10,5	9,3-13,5
3000	4,1	2,1-5,1	3,3	2,3-5,7	9,8	8,8-11,5	10,3	9-12,4
1000	4,1	3-5,2	3,6	3,2-5,7	10,1	9-11,7	10,1	9,6-12,6
300	4	3,2-5,1	3,6	3,42-5,5	10,6	9,3-11,8	11	10,3-13,1
100	4,7	3,1-5,5	4,3	3,3-5,5	10,8	9,2-16,4	10,6	10,1-14,3
10	4,1	2,3-6	3,6	2,6-6,5	11,6	11,5-17,1	11,6	10,7-17,5
0	4,8	2,5-8,9	4,6	3,9-10,4	15,6	14,0-22,1	15,6	13,1-24,5

Tabla 6: TGT en PPP citrado con PPP de SHB con CTI (n=5)

ARC19499 ng/ml	ETP [nM/min]				Pico [nM]			
	Nuevo		Congelado		Nuevo		Congelado	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	1484	1129-1592	1736	1312-1850	74,3	70,5-117	106,1	77-122
3000	1360,7	1074-1459	1635	1229-1702	70,5	59-102	97,9	75-111
1000	1217-5	949-1435	1587,5	1200-1667	68,4	57,1-98,2	94,6	74-107
300	1167	893-1353	1429	999-1493	62,1	53,5-97,2	74,3	61-104
100	1075	671-1228	1154,5	850-1340	58,5	40,7-85	60,1	50-92
10	787,5	431-852	794,9	550-981	40	21,7-46,6	41	32,64
0	403	186-473	642	189-722	14,9	9,2-25,5	29,3	9-35

5

ARC19499 ng/ml	Tiempo de demora [min]				Pico de TT [min]			
	Nuevo		Congelado		Nuevo		Congelado	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	6	4,7-6,3	5,3	4,9-6,4	12	11,3-14,8	13,7	12-14,5
3000	6	4,7-6	5,3	5-5,7	13,3	10,9-15,7	12,7	11,8-4,3
1000	5,3	4,6-6,3	5,5	4,5-6,5	12	10,1-14,6	12,3	11,4-4,4
300	5,5	4,9-5,9	5,7	5,3-5,8	12,7	9,8-14,5	12	11-13,8
100	5,3	4,7-6,2	5,5	5,1-6	12,3	9,9-15,1	12,5	10,9-3,7
10	5,7	4,9-6,8	5,3	5,1-6,5	12,7	11,1-19,7	13,3	11,2-4,3
0	7,8	6,4-9,6	7,2	5,8-8,8	19,8	14,2-23,4	16,7	14,6-8,8

Tabla 7: TGT en PPP citrado con PPP normal con CTI (n=10)

ARC19499 ng/ml	ETP [nM/min]				Pico [nM]			
	Nuevo		Congelado		Nuevo		Congelado	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	1696	1464-2286	2018	1455-2395	257	227-286	265	197-274
3000	1903	1788-2424	1897	1746-2356	245	205-270	261	210-272
1000	1680	1545-2072	1901	1283-2374	227	188-290	229	182-263
300	1964	1533-2245	1903	1548-2245	225	199-245	217	183-288
100	1973	1529-2231	1730	1512-2266	230	200-238	230	189-287
10	2087	1530-2125	2092	1611-2189	239	204-274	220	204-269
0	1847	1517-2329	2159	1745-2462	192	161-298	241	182-300

ARC19499 ng/ml	Tiempo de demora [min]				Pico de TT [min]			
	Nuevo		Congelado		Nuevo		Congelado	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	4,3	3,7-4,6	3,4	3-3,5	7,9	6,7-8,9	8,1	7,2-9,4
3000	3,8	3,6-4,5	3,3	3,1-3,9	7,9	7,5-8,8	7,9	7,5-8,4
1000	4	3,5-4,6	3,5	3,3-3,9	8	7,7-9	7,0	7,4-8,7
300	4	3,5-4,7	3,5	3,2-3,9	8,3	7,9-9,3	8,2	7,3-9
100	3,9	3,3-4,4	3,5	3,1-3,9	8,7	7,9-8,9	8,5	6-10,3
10	3,7	3,4-5,1	4	3,2-5	9	7,9-10,8	9,1	7,2-10
0	4,5	3,7-4,6	3,8	3,2-4,7	9,5	7,1-10,4	9,2	7,5-9,9

10

Ejemplo 28

Este ejemplo demuestra que ARC19499 puede mejorar la coagulación en sangre completa y muestras de plasma de pacientes con hemofilia A y con hemofilia B, tal como se mide mediante tromboelastografía (TEG).

Se recogió sangre en tubos Vacuette de 3,2 ml que contenían citrato de sodio al 3,2 % y 250 µl inhibidor de tripsina de maíz (CTI) 1,3 mg/ml; la concentración de CTI final fue de 100 µg/ml. Se recogieron muestras de pacientes con hemofilia A grave (FVIII <1 %; n=10), moderada (FVIII al 1-5 %; n=7) y leve (FVIII al 5-40 %; n=5), pacientes con hemofilia B grave (FIX <1 %, n=5) y voluntarios sanos (n=10). Para preparar plasma desplaquetado (PPP) para ensayos de CAT, se centrifugaron tubos a 2500×g durante 15 minutos, se transfirió el sobrenadante a tubos Eppendorf nuevos, luego se centrifugó de nuevo a 11000×g durante 5 minutos. Se usó el plasma o bien inmediatamente o bien se congeló a -80 °C para su uso posterior. Para analizar los efectos de ARC19499 sobre la generación de trombina, se añadió ARC19499 a plasma a concentraciones de 10, 100, 300, 1000, 3000 o 10.000 ng/ml (0,9, 9,0, 27,1, 90,3, 271 o 903 nM).

Se realizaron ensayos de tromboelastografía (TEG) usando un instrumento de la serie TEG 5000 de Haemoscope. Se realizaron de TEG de sangre completa añadiendo 300 µl de sangre completa a 40 µl de factor tisular (TF) 9 pM y 20 µl de CaCl₂ 0,2 M en una cubeta de reacción desechable. Se analizaron las trazas de amplitud frente al tiempo para obtener el tiempo de R (duración de tiempo para iniciar la formación de coágulo, amplitud=2 mm), valor de K (medición de la velocidad de formación de coágulo, igual al tiempo de Requerido para alcanzar una amplitud de 20 mm) y el ángulo (otra medición de la velocidad de formación de coágulo, calculada a partir de la tangente del trazado de amplitud dibujado con su origen ajustado al tiempo de R). Se realizaron ensayos de TEG de plasma de manera similar, excepto porque se incluyeron fosfolípidos complementarios (PL). En estos ensayos, se mezclaron 300 µl de PPP con 10 µl de TF 38 pM, 30 µl de PL 48 µM (el 20 % de fosfatidilserina, el 20 % de fosfatidiletanolamina, el 60 % de fosfatidilcolina; Avanti Polar Lipids) y 20 µl de CaCl₂ 0,2 M. La concentración de PL final en estas reacciones fue de 4 µM.

Las figuras 100-103 muestran datos de TG de sangre completa representativos de un voluntario sano (HV), un paciente con hemofilia A grave (SHA), un paciente con hemofilia A moderada (MoHA) y un paciente con hemofilia A leve (MiHA). Se muestran datos medianos para voluntarios sanos, los tres grupos de paciente con hemofilia A, y el grupo de paciente con hemofilia B en la figura 104. Los valores de tiempo de R de nivel inicial se elevaron en todos los grupos de paciente con hemofilia en comparación con controles sanos, lo que indica un retraso en el inicio de la formación de coágulo, observándose el efecto más significativo en las muestras de hemofilia A y B grave. Adicionalmente, se aumentaron los valores de K y los ángulos disminuyeron en muestras de paciente con hemofilia en comparación con controles sanos. Estos dos efectos indican una formación de coágulo menos rápida en comparación con el normal, aunque los efectos fueron similares en todos los grupos de paciente independientemente de la gravedad de factor deficiencia.

Tal como se muestra en las representaciones gráficas de datos individuales (figuras 101-103) y medianos (figura 104), la adición de ARC19499 mejoró la formación de coágulo en sangre completa, tal como se mide mediante TEG. Concentraciones crecientes de ARC19499 (hasta 10.000 ng/ml, 903 nM) normalizaron sustancialmente todos los parámetros de TEG en todos los grupos de paciente (figura 104). ARC19499 restableció el inicio (tiempo de R) y desarrollo (valor de K y ángulo) de formación de coágulo normal.

Se observaron resultados similares en ensayos de TEG de plasma. Se muestran datos de TEG de plasma individual de pacientes representativos con hemofilia A grave (SHA), hemofilia A moderada (MoHA) hemofilia A leve (MiHA) en las figuras 105-107, y se presentan los datos medianos en la figura 108. Los efectos de la coagulación de nivel inicial en muestras de plasma de hemofilia mostraron una tendencia hacia la correlación con la gravedad de la enfermedad en los tres parámetros de TEG, observándose los efectos más sustanciales para muestras de hemofilia A y B grave (figura 108). La adición de ARC19499 mejoró los tres parámetros que describen la formación de coágulo. Concentraciones crecientes de ARC19499 parecían normalizar la coagulación en todos los grupos de paciente, tal como se mide mediante tiempo de R y valor de K. En cambio, mientras que ARC19499 parecía normalizar el ángulo tanto en grupos con hemofilia A leve y moderada, el ángulo en los grupos de hemofilia A y B grave no se corrigió completamente incluso a la concentración más alta de ARC19499 sometida a prueba. No obstante, se observó una mejora sustancial en todos los grupos.

Se presentan datos medianos con intervalos intercuartílicos para mediciones de TEG de sangre completa en las siguientes tablas: tabla 8, hemofilia A grave (SHA); tabla 9, hemofilia A moderada (MoHA); tabla 10, hemofilia A leve (MiHA); tabla 11, hemofilia B grave (SHB); y tabla 12, normal. Tablas adicionales muestran datos medianos con intervalos intercuartílicos para mediciones de TEG de plasma: tabla 13, hemofilia A grave (SHA); tabla 14, hemofilia A moderada (MoHA); tabla 15, hemofilia A leve (MiHA); tabla 16, hemofilia B grave (SHB); y tabla 17, normal. En todas las tablas, se muestra el intervalo normal esperado para cada parámetro en cursiva en el encabezado de la columna. Tomados en conjunto, los datos muestran que ARC19499 mejora la formación de coágulo en plasma de paciente con hemofilia A de todos los niveles de gravedad, y en plasma de hemofilia B grave.

Tabla 8: TEG en sangre citrada con CTI-SHA (n=10)

ARC19499 (ng/ml)	Tiempo de R [min] 10,6-15,6		K [min] 1,2-14,8		Ángulo [gr.] 32,1-56,7	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	11,1	10,2-18,3	4	3,3-6,6	49,6	33,3-54,2
3000	15,2	11,2-20,4	5,3	3,6-7,5	38,7	31,2-50,8
1000	16,4	13,5-21,8	6,8	4,4-9,0	35,7	25,6-47,5
300	19,7	16,4-29,0	8,2	5,4-10,4	30,7	23,6-36,3
100	25,3	19,6-33,0	9	6,3-12,6	25,8	17,1-33,1
10	31,9	25,9-50,9	14,7	11,3-25,3	19,5	11,0-20,1
0	53	43,8-73,0	23	15,8-29,9	8,2	5,0-13,15

Tabla 9: TEG en sangre citrada con CTI-MoHA (n=7)

ARC19499 (ng/ml)	Tiempo de R [min] 5,9-16,3		K [min] 1,7-5,3		Ángulo [gr.] 48,5-59	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	9	4,5-12,4	3,8	3,2-4,8	54,1	51-59
3000	10,7	7,7-16,1	4,7	3,6-6,1	45,3	43,6-52
1000	11,6	6,75-17	6	3,9-10,4	43	29,7-50,3
300	14,1	6,0-16,2	6,7	3,8-10,8	42,5	30,4-48,7
100	14,3	10,2-17,8	7	6,0-9,2	35,9	29,1-40,1
10	18	11,2-21,5	7,4	4,0-10,1	27,7	26,6-37,8
0	28,1	21,7-37,5	17,6	6,8-20,8	17,1	9,3-23,6

5 Tabla 10: TEG en sangre citrada con CTI-MiHA (n=5)

ARC19499 (ng/ml)	Tiempo de R [min] 5,9-16,3		K [min] 1,7-5,3		Ángulo [gr.] 48,5-59	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	7,3	5,5-13,8	4,7	2,7-6,8	48,7	38,4-62,8
3000	7,8	6,5-17,2	8,3	6,4-12,4	42,8	30,0-47,6
1000	8,6	7,9-14,5	11,8	8,0-12,6	41,5	22,0-48,9
300	8,9	7,8-23,1	12,1	9,7-18,5	39,1	21,4-41,0
100	13,3	10,5-24,9	16,6	9,3-22,4	26,8	13,0-41,2
10	16,8	11,8-38,7	19	10,0-32,0	16,5	11,8-30,0
0	22	15,9-46,1	19	10,8-23,8	9,7	5,5-28,0

Tabla 11: TEG en sangre citrada con CTI-SHB (n=5)

ARC19499 (ng/ml)	Tiempo de R [min] 5,9-16,3		K [min] 1,7-5,3		Ángulo [gr.] 48,5-67,9	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	13,5	10,3-16,9	4,9	4,2-6,4	40,3	36-46,6
3000	15,2	12,2-18,6	5,5	5-6,4	41,9	36,3-42,6
1000	20,3	17,6-21,2	6,3	5,4-10,2	30,7	21,6-39,6
300	24,6	22,3-31,8	10,3	8-15,5	24,7	17,9-28,9
100	30,4	24,9-34,9	12,5	9,5-14	17	14,1-24,9
10	35,8	30,3-39,2	13,7	11,8-16,3	13,7	11,8-16,3
0	41,6	39,9-57,8	16	14,4-31,8	10,04	6,2-12,5

10

Tabla 12: TEG en sangre citrada con CTI-HV (n=10)

ARC19499 (ng/ml)	Tiempo de R [min] 5,9-16,3		K [min] 1,7-5,3		Ángulo [gr.] 48,5-67,9	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	9,3	8,7-10,3	2,7	2,1-3,5	58,2	51,7-61,6
3000	8,5	8,3-11,2	3,2	2,3-4,0	58,9	56,7-60,9
1000	8,8	8,4-10,5	2,8	2,2-3,2	57,8	54,8-63,6
300	9,3	8,4-11,2	2,9	2,6-3,4	57,8	54,2-61,2

100	9,9	7,2-12,2	2,8	2,3-4,5	58,5	50,0-62,6
10	10,4	9,4-11,5	2,8	2,3-3,1	57,1	52,0-62,6
0	12	8,6-12,9	3,2	2,8-4,2	56	51,6-57,9

Tabla 13: TEG en PPP citrado con CTI-SHA (n=10)

ARC19499 (ng/ml)	Tiempo de R [min] 10,6-15,6		K [min] 1,2-14,8		Ángulo [gr.] 32,1-56,7	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	10,3	8,9-21,5	10	7,5-14,7	32,3	24,1-38,5
3000	14,2	10,4-23,8	15,4	10,9-17,3	22,3	16,5-25,7
1000	15	15,7-25,7	15,1	12,1-19,0	21,2	18,8-23,9
300	15,7	9,8-29,5	19	7,8-21,0	14,9	11,6-16,8
100	15,8	14,3-34,1	19,6	18,3-21,0	14	10,7-14,4
10	23,6	15,7-29,8	20	19,8-23,0	9,9	8,8-10,7
0	32,6	25,5-55,4	24,1	20,4-27,3	6,1	4,4-7,9

5 Tabla 14: TEG en PPP citrado con CTI-MoHA (n=7)

ARC19499 (ng/ml)	Tiempo de R [min] 10,6-15,6		K [min] 1,2-14,8		Ángulo [gr.] 32,1-56,7	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	13,8	11,5-15,2	7,3	4,9-9,9	40,4	35,8-45,6
3000	16,8	10,6-21	8,5	5,9-8,9	35,6	30,9-40,2
1000	17,9	12-22,1	8,7	5,1-10,1	32	27,1-36,2
300	18,5	12,6-22,5	10,4	7,4-12,3	23	17,3-29,1
100	19,1	11,9-23,5	11,5	9,3-14,4	20,7	19,2-24,6
10	20,9	13,8-25,6	11,9	9,6-14,4	15,2	13,1-18,7
0	23,6	18,2-28,1	16,5	13-18	12	7,9-14

Tabla 15: TEG en PPP citrado con CTI-MiHA (n=5)

ARC19499 (ng/ml)	Tiempo de R [min] 10,6-15,6		K [min] 1,2-14,8		Ángulo [gr.] 32,1-56,7	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	11,8	3,4-11,9	3,3	1,3-3,8	56,6	53,3-73,9
3000	11,8	5,2-13,9	3,4	2,0-4,0	52,6	51,3-66,4
1000	12,8	4,0-14,9	3,4	2,3-4,9	50,6	47,8-62,0
300	14	3,7-18,6	3,7	3,5-3,8	46,4	44,1-52,6
100	14,7	5,6-21,7	5	3,8-6,2	37,9	34,5-41,1
10	15,8	13,9-22,0	7,4	4,2-10,1	29,1	23,5-35,1
0	19,8	17,7-26,9	9,6	4,6-12,2	21,1	16,2-35,0

10

Tabla 16: TEG en PPP citrado con CTI-SHB (n=5)

ARC19499 (ng/ml)	Tiempo de R [min] 10,6-15,6		K [min] 1,2-14,8		Ángulo [gr.] 32,1-56,7	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	10,2	8,2-14,3	7,7	4,8-17,7	31,2	20,6-49,9
3000	12,3	9,7-16,9	14,5	6,5-23,2	26,6	17,2-24,1
1000	19,2	12,7-21,8	23	8,5-26,5	22,4	12,1-30,4
300	21	12,5-28,5	24,2	14,3-28,8	12,5	5,2-20,4
100	22,6	13,6-31,6	19,6	16,8-27,4	5,3	4,9-15,3
10	33,1	16,9-38,3	19,1	17,1-28,4	4,8	3,7-14,1
0	36,7	27,9-44,5	22,5	20,5-59,9	2,6	1,5-7,6

Tabla 17: TEG en PPP citrado con CTI-HV (n=10)

ARC19499 (ng/ml)	Tiempo de R [min]	K [min]	Ángulo [gr.]
---------------------	----------------------	------------	-----------------

15

	10,6-15,6		1,2-14,8		32,1-56,7	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
10000	9,8	6,7-13,2	4,8	3,5-6,4	51,2	50,0-53,2
3000	8,7	7,0-10,7	7,8	5,2-10,8	45	44,0-49,9
1000	11,6	11,0-12,1	10,3	5,8-10,5	40,9	39,9-42,0
300	12,7	12,1-13,8	10,4	6,5-11,3	37,7	36,5-40,3
100	14,3	13,1-15,3	10,1	5,9-11,2	39,3	39,6-49,0
10	15	13,1-15,7	11,7	10,1-11,9	38,8	38,2-44,7
0	12,7	12,1-14,3	7,9	4,9-11,3	40,3	38,5-48,3

Ejemplo 29

Este ejemplo demuestra que la actividad *in vitro* de ARC19499 puede invertirse.

5 Se mezclaron cuatro agentes de inversión (ARC23085, ARC23087, ARC23088 y ARC23089) con ARC19499 y se sometieron a prueba tanto en los ensayos de trombograma automatizado calibrado (CAT) como de tromboelastografía (TEG®) en plasma de hemofilia A (figura 109).

10 Para el ensayo de CAT, se incubó ARC19499 con cada agente de inversión de manera individual durante 5 minutos a 37 °C. Entonces se añadió la mezcla a plasma de hemofilia A a una concentración final de ARC19499 100 nM y concentraciones crecientes de ARC23085, ARC23087, ARC23088, o ARC23089 (2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 nM). Luego se realizó el ensayo de CAT tal como se describió previamente usando una concentración final de TF de 1,0 pM. ARC19499 solo mejoró el ETP de plasma de hemofilia A desde ~600 nM hasta ~900 nM (figura 109A). Los cuatro agentes de inversión sometidos a prueba bloquearon esta mejora cuando se sometieron a prueba a concentraciones >80 nM. ARC23085 y ARC23089 invirtieron casi completamente la actividad de ARC19499 a 160 nM, mientras que ARC23087 y ARC23088 invirtieron casi completamente la actividad de ARC19499 a 320 nM. Observando la trombina pico (figura 109B), los cuatro agentes de inversión mostraron una inversión parcial similar de la actividad de ARC19499 a 80 nM. De nuevo, en 160 nM, ARC23085 y ARC23089 invirtieron completamente la actividad de ARC19499, mientras que los otros dos agentes de inversión lo hicieron en 320 nM.

25 Para el ensayo TEG®, ARC19499 y uno de cada uno de los cuatro agentes de inversión se mezclaron con plasma de hemofilia A, y se inició la coagulación con la adición de TF y CaCl₂. Esto se realizó con y sin una preincubación de 5 minutos de ARC19499 y el adicional agente de inversión a 37 °C. Cuando se sometió a prueba ARC19499 solo, el aptámero corrigió el valor de R prolongado de plasma de hemofilia A de desde 54 minutos hasta 8,3 minutos (figura 109C). ARC23085 invirtió parcialmente esta mejora con valores de R de 30 y 24 minutos con y sin la preincubación de 5 minutos, respectivamente. ARC23087 no demostró capacidad para invertir ARC19499 cuando no hubo preincubación, pero con la incubación sí invirtió la actividad de ARC19499, dando como resultado un valor de R de 38 minutos. ARC23088 demostró poca o ninguna capacidad para invertir la actividad de ARC19499 en este ensayo, independiente de cualquier preincubación. De manera similar a ARC23087, ARC23089 mostró poca capacidad para invertir la actividad de ARC19499 cuando no hubo preincubación. Pero se incubó cuando el agente de inversión con ARC19499 antes del ensayo, invirtió la actividad de ARC19499 casi completamente, dando como resultado un valor de R de 42 minutos (figura 109C).

35 Estos experimentos indican que la actividad *in vitro* de ARC19499 puede invertirse.

Ejemplo 30

40 Este ejemplo demuestra que ARC19499 no inhibe la actividad anticoagulante *in vitro* de heparina de bajo peso molecular (LMWH).

45 En este ensayo, se mezclaron juntas concentraciones crecientes de ARC19499 y concentraciones crecientes de LMWH y se añadieron a plasma de hemofilia A. Se analizó la capacidad de generación de trombina de estas mezclas de plasma usando el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT). La figura 110 muestra las curvas de generación de trombina de las concentraciones de aptámero crecientes en presencia de cada concentración de LMWH. ARC19499 se sometió a prueba a 0,1, 1, 10, 100 y 1000 nM. LMWH se sometió a prueba a 0 (figura 110A), 0,156 (figura 110B), 0,312 (figura 110C), 0,625 (figura 110D), 1,25 (figura 110E), 2,5 (figura 110F) y 5,0 UI (unidades internacionales)/ml (figura 110G).

50 En la figura 111A, se representaron gráficamente los valores de ETP para cada combinación a lo largo del eje y, con las concentraciones de LMWH en el eje x. Lo mismo ocurrió para valores de trombina pico en la figura 111B. En ambos casos, dosis terapéuticas de LMWH (0,5-1,0 UI/ml) inhibieron fuertemente la generación de trombina, y mayores concentraciones evitaron casi completamente que se generara ninguna trombina, incluso en presencia de hasta ARC19499 100 nM (figura 111). Se calcularon los valores de CI₅₀ de 381 ± 24,3 nM y 299 ± 18,0 nM para LMWH a partir de los datos de ETP y trombina pico, respectivamente, en ausencia de ARC19499, y estos resultados son coherentes con mediciones anteriores (Robert *et al.*, Is thrombin generation the new rapid, reliable and relevant

pharmacological tool for the development of anticoagulant drugs?, Pharmacol Res. 2009; 59:160-166). Concentraciones crecientes de ARC19499 no parecían alterar significativamente la CI_{50} de LMWH (figura 112), lo que indica que ARC19499 no interfiere con la actividad anticoagulante de LMWH.

- 5 Este experimento indica que incluso en presencia de ARC19499 100 nM, las dosis terapéuticas de LMWH siguen siendo anticoagulantes en un ensayo *in vitro*.

Ejemplo 31

- 10 Este ejemplo demuestra que los aptámeros frente a TFPI son estables con respecto a nucleasas séricas.

En este experimento, se incubaron 50 μ M de cada aptámero en suero de humano, de macaco cangrejero o de rata mezclado al 90 % durante 72 horas a 37 °C. Se analizaron muestras mediante HPLC y se determinó el porcentaje restante en función del tiempo de incubación, tal como se muestra en la figura 113.

- 15 Tanto ARC19498 como ARC19499 fueron >95 % estables a lo largo del transcurso de 72 horas en suero de humano, de mono y de rata (figuras 113A y 113B).

- 20 ARC19500 fue >92 % estable a lo largo del transcurso de 72 horas en suero de humano, de mono y de rata (figura 113C), y ARC19501 fue >80 % estable a lo largo del transcurso de 72 horas en suero de humano, de mono y de rata (figura 113D).

- 25 ARC19881 fue >78 % estable a lo largo del transcurso de 72 horas en suero de humano, de mono y de rata (figura 113E), y ARC19882 fue >91 % estable a lo largo del transcurso de 72 horas en suero de humano, de mono y de rata (figura 113F).

Ejemplo 32

- 30 Este ejemplo demuestra que los aptámeros frente a TFPI tienen actividad biológica.

- En este experimento, se creó un modelo de primate no humano de hemofilia A inyectando a macacos cangrejeros un único bolo intravenoso (i.v.) de anticuerpo policlonal de oveja frente a factor VIII humano (20 mg; 50.000 unidades Bethesda). 3,5 horas después de la inyección i.v., se trataron los monos con o bien solución salina (1 ml/kg), factor VIIa recombinante (FVIIar) (NovoSeven®; 90 μ g/kg de bolo) o bien ARC19499 (o bien un bolo de 600 μ g/kg, 35 300 μ g/kg o 100 μ g/kg). Se adquirieron muestras de sangre citrada antes de la administración de anticuerpos (nivel inicial), 2,5 horas tras la administración de anticuerpos, 15 minutos tras el tratamiento con fármaco/solución salina (tiempo=3,75 horas), y 1 y 2 horas tras el tratamiento con fármaco/solución salina (tiempo= 4,5 y 5,5 horas, respectivamente). Se procesó sangre para generar plasma, y se sometieron a ensayos muestras de plasma citrado para determinar el tiempo de protrombina (PT), tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT), función de factor 40 VIII y tromboelastografía (TEG®). El mono tratado con solución salina recibió un tratamiento de ARC19499 (600 μ g/kg) después de que se extrajera el punto de tiempo de 5,5 horas. Quince minutos después de recibir este tratamiento, se extrajo otra muestra de sangre citrada y se procesó para plasma.

- 45 Con el fin de garantizar que ARC19499 inhibe TFPI de mono, se mezclaron plasmas tomados de monos después del tratamiento con anticuerpo, *ex vivo*, con concentraciones crecientes de ARC19499 de desde 1 hasta 1000 nM, y se sometieron a prueba en un ensayo de TEG® (figura 114). Se comparó el plasma mezclado con aptámero con plasma sin aptámero, tanto antes como después del tratamiento con anticuerpo (líneas continuas y discontinuas, respectivamente). El tratamiento con anticuerpo solo prolongó el valor de R. La adición de ARC19499 a este plasma tratado con anticuerpo corrigió el valor de R hasta niveles casi iniciales, lo que sugiere que el aptámero era reactivo 50 de manera cruzada con plasma de mono.

- En la muestra de plasma extraída 2,5 horas después de la inyección de anticuerpo, los niveles de factor VIII estaban por debajo del 0,6 % y permanecieron así durante el transcurso del ensayo de 5,5 horas (figura 115). Tal como se esperaba, el PT, que no es sensible a FVIII, permaneció sin cambios después de la administración de anticuerpos 55 (figura 116A); sin embargo, tras la inyección de FVIIar, hubo una ligera caída en los valores de PT de desde $13,0 \pm 0,4$ hasta $10,7 \pm 0,4$ segundos. Los valores de aPTT aumentaron después de la administración del anticuerpo frente a factor VIII (figura 116B). Tal como se observa en el ensayo de PT, la administración de FVIIar dio como resultado una disminución en el tiempo de coagulación en el ensayo de aPTT. No hubo cambio en los valores de aPTT tras el tratamiento con solución salina. El tratamiento con ARC19499 (en todas las concentraciones) dio como resultado 60 una prolongación en aPTT. El animal tratado con solución salina que recibió un bolo de ARC19499 tras el punto de tiempo de 5,5 horas también mostró una prolongación en aPTT tras la administración de aptámero. Se sometió a ensayo el efecto del tratamiento con ARC19499 sobre el desarrollo de coágulo en este modelo de tipo hemofilia A usando TEG® activada con factor tisular (TF). En todos los animales sometidos a prueba, la administración de anticuerpos dio como resultado una prolongación en el valor de R (figura 117A). El tratamiento con solución salina 65 no tuvo efecto adicional sobre el valor de R, mientras que tanto FVIIar como los tratamientos con 600 μ g/kg y 300

µg/kg de ARC19499 dieron como resultado una disminución en los valores de R hasta valores próximos al nivel inicial. La dosis de 100 µg/kg de ARC19499 fue una dosis ineficaz y no tuvo un efecto positivo sobre el valor de R. En el mono tratado con solución salina, la inyección adicional de ARC19499 al final del estudio tuvo un efecto inmediato sobre la disminución del valor de R. Se redujeron tanto el ángulo (figura 117B) como la amplitud máxima (MA) (figura 117C) después de la administración de anticuerpos. Los tratamientos con 600 µg/kg y 300 µg/kg de ARC19499 parecían tener efectos de aumento similares sobre el ángulo como NovoSeven®; mientras que el tratamiento con 100 µg/kg de ARC19499 se comportó de manera similar al tratamiento con solución salina (figura 117B). Todos los tratamientos, incluyendo la solución salina, parecían no tener efecto adicional sobre MA (figura 117C).

En un segundo conjunto de experimentos relacionados, se trataron monos con la misma concentración de anticuerpo anti-FVIII seguido por ARC19499 300 µg/kg o NovoSeven® 90 µg/kg 1 hora después. Se adquirieron muestras de sangre citrada y se procesaron para plasma en el nivel inicial, 60 minutos después de la administración de anticuerpos, y 60, 120, 180, 240, 300 y 420 minutos tras la administración del fármaco. Se sometieron a prueba muestras de plasma usando el ensayo de TEG® activada por TF tal como se describió anteriormente. Tal como anteriormente, la administración de anticuerpos dio como resultado un aumento en los valores de R (figura 118A), y una disminución en el ángulo y los valores de MA (figura 118B-C). ARC19499 y NovoSeven® se comportaron de maneras muy similares, restableciendo los valores de R hasta niveles casi iniciales y mejorando tanto el ángulo como los valores de MA (figura 118).

Tomados en conjunto, el factor VIII, aPTT y TEG® indican la inducción ventajosa de un estado similar a la hemofilia A en estos monos. La prolongación moderada del aPTT tras la inyección de ARC19499 refleja más probablemente, además, inhibición no específica de la cascada intrínseca, lo cual se ha observado previamente con otros aptámeros. Sin embargo, la clara corrección del tiempo de formación de coágulo (valor de R) en plasma activado por TF medido mediante el ensayo de TEG® sugiere que el defecto hemostático debido a pérdida del factor VIII se evitó ventajosamente mediante inhibición con ARC19499 de TFPI.

Una observación adicional del tratamiento con ARC19499 fue que parecía dar como resultado un aumento en los niveles plasmáticos de TFPI. En un experimento preliminar, las concentraciones TFPI en muestras de estos experimentos con macacos cangrejeros mencionados anteriormente, seguido por tratamiento con ARC19499, superaron el límite superior de cuantificación del ELISA de TFPI cuando se diluyen 1:40. Este efecto se analizó más minuciosamente midiendo los niveles de TFPI en muestras con EDTA de plasma de macacos cangrejeros que recibieron una dosis muy alta (20 mg/kg) de ARC19499 o bien a través de administración i.v. o bien subcutánea (s.c.). Se extrajeron muestras de sangre periódicamente durante dos semanas, lo que permitió la evaluación de los cambios en las concentraciones de TFPI en plasma tras una exposición más prolongada a ARC19499. Se midieron las concentraciones de TFPI en muestras de plasma diluidas en serie (diluidas hasta 1:1600) en los siguientes puntos de tiempo: antes de la dosis, 0,083 (solo i.v.), 0,5, 2, 6, 12, 36, 72, 120, 168, 240 y 336 horas tras la dosis. En los animales tratados con o bien una dosis i.v. o bien s.c. de ARC19499, los niveles de TFPI aumentaron inmediatamente desde $\approx 0,2$ nM (antes de la dosis) hasta 5-7 nM en el primer punto de tiempo, luego más gradualmente a lo largo del tiempo hasta niveles pico de 91 ± 12 y 71 ± 2 nM, respectivamente (figura 119). El patrón de niveles de TFPI fue similar en los monos tratados con o bien una dosis i.v. o bien s.c., aumentando hasta niveles pico a las 72-120 horas seguido por un decline gradual. Sin embargo, las estimaciones de $t_{\max}$ de ARC19499 fueron de 5 minutos y 24 horas para las dosis i.v. y s.c., respectivamente (datos no mostrados). Por tanto, aunque ARC19499 estimuló un aumento en TFPI en plasma *in vivo*, los cambios en TFPI y las concentraciones de ARC19499 a lo largo del tiempo no se correlacionaron necesariamente. Se desconoce el mecanismo para el aumento en TFPI, pero es posible que la exposición inicial a ARC19499 provocara la liberación rápida de TFPI de la superficie endotelial mientras que aumentos posteriores se debieron a la liberación lenta de TFPI de almacenamientos intracelulares, regulación por incremento de la expresión de TFPI, y/o inhibición de los mecanismos de aclaramiento de TFPI. Este aumento en los niveles de TFPI en plasma tras el tratamiento con aptámero fue específico para ARC19499. Un aptámero contra una diana distinta TFPI no parecía aumentar los niveles de TFPI, especialmente no al mismo nivel que ARC19499 (datos no mostrados).

Ejemplo 33

Este ejemplo demuestra que ARC19499 acorta el tiempo de hemorragia en un modelo de primate no humano (NHP) de hemofilia A y que esto acortó el tiempo de hemorragia se refleja en la mayoría de los casos por una corrección concomitante en el valor de R de tromboelastografía (TEG®) (una medición del tiempo hasta la formación de coágulo inicial) a partir del valor de R prolongado asociado con hemofilia A y presente en el modelo de NHP descrito a continuación.

Se evaluó el tiempo de hemorragia, con y sin tratamiento con ARC19499, en un modelo de NHP de hemofilia A en el que se trataron macacos cangrejeros con un anticuerpo anti-FVIII (Ac frente a FVIII) para inducir un estado similar a la hemofilia A. Tal como se representa en forma de diagrama en la figura 120, se midió el tiempo de hemorragia al inicio del experimento (nivel inicial), y luego 2,5 horas tras la administración de Ac frente a FVIII. Entonces se inició el tratamiento con dosis de bolo de 1 mg/kg de ARC19499. Se midió el tiempo de hemorragia 1 hora después de la

primera dosis de ARC19499 para todos los grupos de monos. Para los monos cuyos tiempos de hemorragia no se habían corregido, se evaluó de nuevo el tiempo de hemorragia 17 minutos tras la segunda dosis de ARC19499. Para los monos cuyos tiempos de hemorragia aún no se habían corregido, se evaluó de nuevo el tiempo de hemorragia 17 minutos tras la tercera dosis de ARC19499 (grupos 3 y 4).

Para la evaluación del tiempo de hemorragia y recogida de muestras de sangre, se anestesió un mono, y se le colocó una vía en la vena femoral para determinaciones de la presión sanguínea y se cateterizó la vena safena en el lado opuesto de la vena safena usada para la evaluación del tiempo de hemorragia con un catéter del calibre 22 para dosificar y muestrear. El programa para la evaluación del tiempo de hemorragia y la dosificación relacionada con Ac frente a FVIII ARC19499 y la extracción de muestras de sangre se indican en la figura 120. Se tomó una muestra de sangre del nivel inicial antes del tratamiento y un tiempo de hemorragia (tiempo de hemorragia antes del tratamiento, BT_0) 10 y 5 minutos, respectivamente, antes de la dosificación con Ac frente a FVIII. Se tomaron muestras de sangre extrayendo aproximadamente 3-4 ml de sangre mezclada con solución salina, que se dejó aparte. Luego se tomó entonces una muestra de sangre no diluida usando una jeringa. La sangre recogida se inyectó inmediatamente en tubos que contenían citrato y se invirtió diez veces para mezclar. Se analizó una muestra de la sangre completa con citrato mediante TEG[®] y se procesó para el análisis la sangre citrada restante para obtener plasma. Entonces se volvió a inyectar la primera muestra de sangre con solución salina al mono, seguido por una descarga de solución salina equivalente al volumen de muestra de sangre tomada.

La vena safena se expuso para la evaluación del tiempo de hemorragia. Se dobló cuidadosamente una aguja hipodérmica de 1 pulgada del calibre 22 (Kendall Monoject, Kendall Healthcare, Mansfield, MA) en el bisel hasta un ángulo de 90 °C usando un hemostato; la curva fue de 5 mm desde la punta de la aguja. La aguja se insertó en la vena expuesta hasta la curva en la aguja, punzando únicamente una pared de la vena. Se absorbe sangre de la vena usando papel absorbente para tiempo de hemorragia Surgicutt (ITC, Edison, NJ); se tuvo cuidado de no tocar el sitio de punción real. Se midió el tiempo desde el momento en el que empezó la hemorragia hasta el cese de la hemorragia, tal como se determina mediante la incapacidad de absorber sangre. Se tomaron lecturas de la presión sanguínea de uno a cinco minutos antes y después de la evaluación del tiempo de hemorragia. Después de la evaluación del tiempo de hemorragia, se cerró la herida con Gluture (Abbott Labs, Abbott Park, IL).

Se administró Ac frente a FVIII (anticuerpo policlonal anti-FVIII humano de oveja, lote Y1217, de Haematologic Technologies Inc (Essex Junction, VT)) a monos por vía intravenosa (i.v.) como una única dosis de bolo lento a través de un catéter del calibre 22 colocado en la vena safena en el lado opuesto de la vena safena usado para la evaluación del tiempo de hemorragia. Se mantuvo congelado a -80 °C hasta su uso, y se descongeló y se volvió a congelar no más de 3 veces antes de su uso. Cada mono recibió 12.642 unidades Bethesda/kg de Ac frente a FVIII. Dos horas después de que se administrara Ac frente a FVIII, se tomó otra muestra de sangre; 30 minutos después se evaluó el tiempo de hemorragia (tiempo de hemorragia tras FVIII, BT_{FVIII}). Se administró una primera dosis de ARC19499 por vía i.v. como un único bolo lento. En todos los casos antes de dosificar o bien el Ac frente a FVIII o bien ARC19499, se retiraron 0,5-1,0 ml de fluido del catéter, se administró el Ac frente a FVIII o ARC19499, y luego se enjuagó el catéter con 2-3 ml de solución salina templada. Se tomó una muestra de sangre 55 minutos después. Una hora tras la administración de la primera dosis de ARC19499, se evaluó el tiempo de hemorragia (tiempo de hemorragia tras la primera dosis de ARC19499, BT_1). Luego se determinó si el tiempo de hemorragia se había corregido por la primera dosis de ARC19499. Se consideró que se había logrado corrección si la diferencia entre el nivel inicial antes del tratamiento y los tiempos de hemorragia tras la primera dosis de ARC19499 era de menos de la mitad de la diferencia entre el nivel inicial antes del tratamiento y los tiempos de hemorragia tras FVIII (es decir, $(BT_1 - BT_0) / (BT_{FVIII} - BT_0) < 0,5$). Si el tiempo de hemorragia se corrigió ventajosamente, se completó el estudio del tiempo de hemorragia para ese animal. Si no se corrigió el tiempo de hemorragia, se administró una segunda dosis de ARC19499 1 mg/kg diez minutos después del inicio de la evaluación previa del tiempo de hemorragia. Se tomó una muestra de sangre 12 minutos después; se inició una evaluación del tiempo de hemorragia 17 minutos después de la segunda inyección de ARC19499 (tiempo de hemorragia tras la segunda dosis de ARC19499, BT_2). Luego se determinó si el tiempo de hemorragia se había corregido por la segunda dosis de ARC19499. Si se corrigió el tiempo de hemorragia ventajosamente, se completó el estudio del tiempo de hemorragia para ese animal. Si el tiempo de hemorragia no se corrigió, se administró una tercera dosis de ARC19499 1 mg/kg diez minutos después del inicio de la evaluación previa del tiempo de hemorragia. Se tomó una muestra de sangre 12 minutos después; se inició una evaluación del tiempo de hemorragia 17 minutos después de la segunda inyección de ARC19499 (tiempo de hemorragia tras la tercera dosis de ARC19499, BT_3). Luego se determinó si el tiempo de hemorragia se había corregido por la tercera dosis de ARC19499. Independientemente de si se corrigió el tiempo de hemorragia ventajosamente, se completó el estudio del tiempo de hemorragia para ese animal. Si el tiempo de hemorragia no se corrigió, se administró una cuarta dosis de 3 mg/kg ARC19499 14 minutos después del inicio de la evaluación previa del tiempo de hemorragia; se tomó una muestra de sangre para análisis de TEG[®] de sangre completa pero no se evaluaron tiempos de hemorragia adicionales debido a la falta de vena disponible de tipo similar a la usada en el estudio. Se administró ARC19499 adicional (de 1 a 3 mg/kg) antes de la recuperación de cada animal como precaución frente a la hemorragia durante las siguientes 24 horas. Los puntos reales de tiempo para la extracción de muestras de sangre, dosificación del compuesto y evaluación del tiempo de hemorragia para cada animal se encuentran dentro del punto de tiempo de 5 minutos notificado.

En este estudio se midieron los niveles de actividad de FVIIIa en plasma citrado de monos usando el ensayo de

FVIII Coamatic de Chromogenix (Diapharma, Columbus OH). Se compararon muestras adquiridas durante el estudio con una curva patrón generada a partir de una mezcla de las muestras de plasma de nivel inicial antes del tratamiento. Se diluyeron todas las muestras y patrones 80x en tampón de reacción proporcionado por el kit. Se llevó a cabo la reacción según las instrucciones del fabricante, leyendo el cambio en la absorbancia a 405 nm durante 45 minutos. Se muestran los niveles de actividad de FVIII asociado con las muestras de plasma de macaco cangrejero en la tabla 18 y la figura 121 (tabla 18A y la figura 121A: grupo 1: monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron con una dosis de ARC19499 1 mg/kg; tabla 18B y la figura 121B: grupo 2: monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg; tabla 18C y la figura 121C: grupo 3: mono cuyo tiempo de hemorragia se corrigió con tres dosis de ARC19499 1 mg/kg; tabla 18D y la figura 121D: grupo 4: mono cuyo tiempo de hemorragia no se corrigió con tres dosis de ARC19499 1 mg/kg). Antes del tratamiento con anticuerpo, el plasma de todos los monos tenía niveles muy altos de actividad de FVIII, que oscilaban entre el 57,6 % y el 93,5 % (tabla 18). Tras el tratamiento con anticuerpo, esta actividad disminuyó hasta por debajo de niveles medibles (menos del 0,1 %) en todos los animales, y permaneció baja durante el transcurso del ensayo (figura 121). De manera más importante, no hubo diferencia mencionadas por este ensayo en el nivel de inactivación de FVIII entre los diferentes grupos de animales, lo que indica que la dosis de ARC19499 requerida para corregir el tiempo de hemorragia no estaba relacionada con niveles diferentes de actividad de FVIII tras la administración de Ac frente a FVIII.

Tabla 18. Niveles de actividad de FVIII

A. Grupo 1: Monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante una dosis de ARC19499 1 mg/kg							
	Punto de tiempo	NHP 0703333	NHP 0704039	NHP 0701565	NHP 0604313	NHP 0703551	NHP 0603477
	(min)	%	%	%	%	%	%
Nivel inicial	-10	64,4	57,6	74,1	93,5	71,8	82,4
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	-1,6	-2,2	-1,8	-1,5	-1,8	-2,6
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	-1,5	-2,1	-1,8	-2,2	-1,6	-2,3

B. Grupo 2: Monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante dos dosis de ARC19499 1 mg/kg						
	Punto de tiempo	NHP 0610301	NHP 0702277	NHP 0611655	NHP 0511011	
	(min)	%	%	%	%	
Nivel inicial	-10	63,0	79,6	59,5	89,7	
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	-2,1	-0,3	-2,3	-2,0	
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	-2,2	-0,1	-2,2	-1,9	
12 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	237	ns	0,1	-2,2	-1,7	

C. Grupo 3: Mono cuyo tiempo de hemorragia se corrigió mediante tres dosis de ARC19499 1 mg/kg		
	Punto de tiempo	NHP0702073
	(min)	%
Nivel inicial	-10	76,8
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	0,0
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	-0,2
12 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	239	-0,3
12 min tras el tercer tratamiento con ARC19499	278	0,3

D. Grupo 4: Mono cuyo tiempo de hemorragia no se corrigió mediante tres dosis de ARC19499 1 mg/kg		
	Punto de tiempo	NHP0702073
	(min)	%
Nivel inicial	-10	62,5
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	0,8
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	-1,4
12 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	237	-2,0
12 min tras el tercer tratamiento con ARC19499	264	-2,0
12 min tras el cuarto tratamiento con ARC19499	296	-1,7

Los tiempos de hemorragia de grupo medios ($\pm$ EEM) para monos del grupo 1 (cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron con una dosis de ARC19499 1 mg/kg) se muestran en la tabla 19. Los tiempos de hemorragia de grupo medios para este grupo también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de las muestras de sangre en la figura 122 (figura 122A: en segundos, figura 122B: en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial). El tratamiento con el anticuerpo anti-FVIII dio como resultado una prolongación del tiempo de hemorragia medio del grupo hasta 203 ± 15 % del tiempo de hemorragia medio del grupo en el nivel inicial. El

tratamiento de los monos con ARC19499 1 mg/kg corrigió el tiempo de hemorragia medio del grupo de nuevo a niveles esencialmente iniciales (102 ± 11 % del tiempo de hemorragia medio del grupo en el nivel inicial). Se muestran tiempos de hemorragia individuales para monos del grupo 1 en la tabla 20; también se representan gráficamente los tiempos de hemorragia individuales de los monos en la figura 123 (figura 123A: en segundos, figura 123B: en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial). Todos los monos en este grupo mostraron una prolongación de sus tiempos de hemorragia en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII en comparación con sus tiempos de hemorragia de nivel inicial (intervalo: del 162 al 252 % del tiempo de hemorragia del nivel inicial). Todos los monos en este grupo también presentaron una corrección de sus tiempos de hemorragia en respuesta a la administración de ARC19499 1 mg/kg en comparación con sus tiempos de hemorragia de nivel inicial (intervalo: del 82 al 152 % del tiempo de hemorragia del nivel inicial).

Tabla 19. Tiempos de hemorragia medios en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante una dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 1)

Grupo 1: Tiempos de hemorragia medios			
	Punto de tiempo	Media	EEM
	(min)	(s)	(s)
Nivel inicial	-5	41	5,1
2,5 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	150	84	13
1 h tras el tratamiento con ARC19499	215	40	3,5

Tabla 20. Tiempos de hemorragia individuales en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante una dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 1)

Grupo 1: Tiempos de hemorragia individuales							
	Punto de tiempo	NHP 0703333	NHP 0704039	NHP 0701565	NHP 0604313	NHP 0703551	NHP 0603477
	(min)	(s)	(s)	(s)	(s)	(s)	(s)
Nivel inicial	-5	36	23	45	42	41	61
2,5 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	150	62	58	85	68	85	145
1 h tras el tratamiento con ARC19499	215	31	35	37	47	38	54

Los tiempos de hemorragia de grupo medios ($\pm$ EEM) para monos del grupo 2 (cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg) se muestran en la tabla 21. Los tiempos de hemorragia de grupo medios para este grupo también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de las muestras de sangre en la figura 124 (figura 124A: en segundos, figura 124B: en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial). El tratamiento con el anticuerpo anti-FVIII dio como resultado una prolongación del tiempo de hemorragia medio del grupo hasta 195 ± 26 % del tiempo de hemorragia medio del grupo en el nivel inicial. Después del tratamiento de los monos con ARC19499 1 mg/kg, el tiempo de hemorragia medio del grupo disminuyó, pero solo hasta 175 ± 20 % del tiempo de hemorragia medio del grupo en el nivel inicial. Una dosis adicional de ARC19499 1 mg/kg redujo posteriormente el tiempo de hemorragia medio del grupo hasta niveles esencialmente iniciales (94 ± 17 % del tiempo de hemorragia medio del grupo en el nivel inicial). Se muestran tiempos de hemorragia individuales para monos del grupo 2 en la tabla 22; también se representan gráficamente los tiempos de hemorragia individuales de los monos en la figura 125 (figura 125A: en segundos, figura 125B: en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial). Todos los monos en este grupo mostraron una prolongación de sus tiempos de hemorragia en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII en comparación con sus tiempos de hemorragia antes del tratamiento en el nivel inicial (intervalo: del 143 al 263 % del tiempo de hemorragia del nivel inicial). Después de la administración de ARC19499 1 mg/kg, tres de los monos presentaron una ligera disminución en sus tiempos de hemorragia mientras que un mono presentó un pequeño aumento en el tiempo de hemorragia. Todos los monos en este grupo presentaron una corrección de sus tiempos de hemorragia en respuesta a una segunda dosis de ARC19499 1 mg/kg (intervalo: del 61 al 138 % del tiempo de hemorragia de nivel inicial).

Tabla 21. Tiempos de hemorragia medios en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante dos dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 2)

Grupo 2: Tiempos de hemorragia medios			
	Punto de tiempo	Media	EEM
	(min)	(s)	(s)
Nivel inicial	-5	35	12

2,5 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	150	62	13
1 h tras el primer tratamiento con ARC19499	215	59	16
17 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	242	31	8,4

Tabla 22. Tiempos de hemorragia individuales en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante dos dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 2)

Grupo 2: Tiempos de hemorragia individuales					
	Punto de tiempo	NHP 0610301	NHP 0702277	NHP 0611655	NHP 0511011
	(min)	(s)	(s)	(s)	(s)
Nivel inicial	-5	29	23	70	19
2,5 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	150	60	38	100	50
1 h tras el primer tratamiento con ARC19499	215	50	33	107	44
17 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	242	40	14	50	20

5 Los tiempos de hemorragia para el mono del grupo 3 se muestran en la tabla 23; los tiempos de hemorragia también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de las muestras de sangre en la figura 126 (figura 126A: en segundos, figura 126B: en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial). Este mono mostró una
10 prolongación de su tiempo de hemorragia en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII hasta el 220 % del tiempo de hemorragia del nivel inicial. En respuesta al tratamiento con dosis de 1 mg/kg de ARC19499, el tiempo de hemorragia aumentó hasta el 330 % del nivel inicial. El tratamiento de este mono con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg produjo una reducción del tiempo de hemorragia hasta el 210 % del tiempo de hemorragia del nivel inicial. Para confirmar que efectivamente esta segunda dosis no había corregido el tiempo de hemorragia, se realizó una
15 evaluación adicional del tiempo de hemorragia 38 minutos después de la administración de la segunda dosis de ARC19499. Este tiempo de hemorragia de 45 segundos fue muy próximo a los 42 segundos medidos 12 minutos después de que se administrara la segunda dosis de ARC19499, lo que confirma que el tiempo de hemorragia no se había corregido mediante las dos dosis de ARC19499. Una dosis adicional de ARC19499 1 mg/kg corrigió el tiempo de hemorragia hasta el 85 % del tiempo de hemorragia del nivel inicial.

20 Tabla 23. Tiempos de hemorragia en el mono cuyo tiempo de hemorragia se corrigió mediante tres dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 3)

Grupo 3: Tiempos de hemorragia		
	Punto de tiempo	NHP0702073
	(min)	(s)
Nivel inicial	-5	20
2,5 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	150	44
1 h tras el primer tratamiento con ARC19499	215	66
17 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	243	42
37 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	263	45
17 min tras el tercer tratamiento con ARC19499	282	17

25 Los tiempos de hemorragia para el mono del grupo 4 se muestran en la tabla 24; los tiempos de hemorragia también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de las muestras de sangre en la figura 127 (figura 127A: en segundos, figura 127B: en lo que se refiere al % del tiempo de hemorragia de nivel inicial). Este mono mostró una
30 prolongación de su tiempo de hemorragia en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII hasta el 143 % del tiempo de hemorragia del nivel inicial. En respuesta al tratamiento con dosis de 1 mg/kg de ARC19499, el tiempo de hemorragia aumentó notablemente hasta el 193 % del tiempo de hemorragia del nivel inicial. El tiempo de hemorragia tras el tratamiento de este mono con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg disminuyó luego hasta el 154 % del tiempo de hemorragia del nivel inicial. Una dosis adicional de ARC19499 1 mg/kg no pudo cambiar significativamente el tiempo de hemorragia, que era ahora el 159 % del tiempo de hemorragia del nivel inicial. No

pudo realizarse evaluación adicional de los tiempos de hemorragia en este animal debido a la carencia de una vena disponible suficiente coherente con la usada para las evaluaciones anteriores.

Tabla 24. Tiempos de hemorragia en el mono cuyo tiempo de hemorragia no se corrigió mediante tres dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 4)

Grupo 4: Tiempos de hemorragia		
	Punto de tiempo	NHP0607367
	(min)	(s)
Nivel inicial	-5	56
2,5 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	150	80
1 h tras el primer tratamiento con ARC19499	215	108
17 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	243	86
17 min tras el tercer tratamiento con ARC19499	273	89

Se analizó el estado de coagulación de sangre completa de macaco cangrejero usando el ensayo TEG[®] en muestras de sangre completa con citrato. Para iniciar la reacción de coagulación, se añadieron 330 µl de sangre completa con citrato a una cubeta desechable (Haemonetics Corp, n.º de catálogo 6211) que contenía 20 µl de 0,2 M [Haemonetics Corporation (Braintree, MA)] y 10 µl de factor tisular (TF) (disolución final de 1:200000 a 37 °C). Se usó Innovin (Dade-Behring, Newark, DE) como fuente de factor tisular (TF), reconstituido en agua según la recomendación del fabricante, y se diluyó 1:5555 en solución salina al 0,9 % antes de su uso. Se almacenó Innovin de reserva reconstituido a 4 °C durante menos de 4 semanas. Se midió el tiempo hasta la formación de coágulo inicial (valor de R) usando el sistema Haemoscope TEG[®] 5000 (Haemonetics Corporation, Braintree, MA).

Los valores de R de grupo medios ($\pm$ EEM) para monos del grupo 1 (cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron con una dosis de ARC19499 1 mg/kg) se muestran en la tabla 25. Los valores de R de grupo medios también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de la muestra de sangre (figura 128). El tratamiento con Ac frente a FVIII dio como resultado una prolongación del valor de R medio de grupo de hasta aproximadamente 4,8 veces el valor de R medio de grupo en el nivel inicial. Aunque el tratamiento de los monos con ARC19499 1 mg/kg redujo el valor de R medio de grupo con respecto al obtenido tras el tratamiento con Ac frente a FVIII, este valor de R todavía fue de aproximadamente 3,2 veces el valor R de nivel inicial medio de grupo. Los valores de R individuales para monos del grupo 1 se muestran en la tabla 26; los valores de R individuales también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de la muestra de sangre en la figura 129. Todos los monos en este grupo mostraron una prolongación de sus valores de R en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII en comparación con sus valores de R antes del tratamiento de nivel inicial (intervalo de 2,9 a 9,4 veces). Todos excepto uno de los monos en este grupo también mostraron una reducción de sus valores de R en respuesta a la administración de ARC19499 1 mg/kg en comparación con sus valores de R antes del tratamiento de nivel inicial (intervalo de 1,4 a 5,3 veces). Un mono, NHP0701565, mostró un ligero aumento en el valor de R tras la administración de ARC19499 1 mg/kg.

Tabla 25. Valores de R medios mediante TEG[®] en sangre completa en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante una dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 1)

Grupo 1: Valores de R medios mediante TEG [®] en sangre completa			
	Punto de tiempo	Media	EEM
	(min)	(min)	(min)
Nivel inicial	-10	5,6	0,93
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	27	3,3
55 min tras el tratamiento con ARC19499	210	18	4,8

Tabla 26. Valores de R individuales mediante TEG[®] en sangre completa en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante una dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 1)

Grupo 1: Valores de R individuales mediante TEG [®] en sangre completa							
	Punto de tiempo	NHP 0703333	NHP 0704039	NHP 0701565	NHP 0604313	NHP 0703551	NHP 0603477
	(min)	(min)	(min)	(min)	(min)	(min)	(min)
Nivel inicial	-10	8,5	ns	6,0	2,2	5,0	6,2
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	38,6	28,8	34	20,7	22,6	17,8
55 min tras el tratamiento con ARC19499	210	29,4	10,9	35,5	11,6	9,8	8,4

Los valores de R de grupo medios ($\pm$ EEM) para monos del grupo 2 (cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron con

dos dosis de ARC19499 1 mg/kg) se muestran en la tabla 27. Los valores de R de grupo medios también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de las muestras de sangre en la figura 130. El tratamiento con el anticuerpo anti-FVIII dio como resultado una prolongación del valor de R de grupo medio de hasta aproximadamente 5,9 veces el valor de R medio de grupo en el nivel inicial. En respuesta al tratamiento con una dosis de 1 mg/kg de ARC19499, que no corrigió el tiempo de hemorragia, el valor de R medio de grupo se redujo hasta aproximadamente 4,0 veces el valor de R medio de grupo de nivel inicial. El tratamiento de los monos con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg, que sí corrigió el tiempo de hemorragia en este grupo, redujo adicionalmente el valor de R medio de grupo con respecto al obtenido tras el tratamiento con Ac frente a FVIII, aunque este valor de R todavía fue de aproximadamente 3,5 veces el valor de R medio de grupo de nivel inicial. Los valores de R individuales para monos del grupo 2 se muestran en la tabla 28; los valores de R individuales también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de la muestra de sangre en la figura 131. Todos los monos en este grupo mostraron una prolongación de sus valores de R en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII en comparación con sus valores de R antes del tratamiento de nivel inicial en el nivel inicial (intervalo de 4,0 a 9,1 veces). Todos excepto uno de los monos en este grupo también mostraron una reducción de sus valores de R en respuesta a la administración de ARC19499 1 mg/kg en comparación con sus valores de R antes del tratamiento de nivel inicial (intervalo de 2,4 a 5,0 veces); el tratamiento de estos monos con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg, que sí corrigió todos los tiempos de hemorragia en este grupo, redujo adicionalmente los valores de R en dos de estos monos, y aumentó ligeramente el valor de R en el tercer mono. Un mono, NHP0611655, mostró un aumento del 103 % en el valor de R en comparación con el valor de R tras la inyección de Ac frente a FVIII tras la administración de ARC19499 1 mg/kg; el tratamiento de este mono con un ARC19499 1 mg/kg adicional, que sí corrigió el tiempo de hemorragia, produjo una disminución en el valor de R hasta 6,4 veces el valor de R de nivel inicial.

Tabla 27. Valores de R medios mediante TEG® en sangre completa en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante dos dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 2)

Grupo 2: Valores de R medios mediante TEG® en sangre completa			
	Punto de tiempo	Media	EEM
	(min)	(min)	(min)
Nivel inicial	-10	6,0	1,0
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	36	4,5
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	24	8,7
12 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	237	21	7,1

Tabla 28. Valores de R individuales mediante TEG® en sangre completa en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante dos dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 2)

Grupo 2: valores de R individuales mediante TEG® en sangre completa					
	Punto de tiempo	NHP 0610301	NHP 0702277	NHP 0611655	NHP 0511011
	(min)	(min)	(min)	(min)	(min)
Nivel inicial	-10	ns	8,1	6,0	4,0
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	46,3	35,8	24,1	36,2
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	8,2	19,8	48,9	19,9
12 min tras el tratamiento con ARC19499	237	6,7	11,9	38,3	25,6

Los valores de R para el mono del grupo 3 se muestran en la tabla 29; los valores de R también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de las muestras de sangre en la figura 132. Este mono mostró, en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII, una prolongación de su valor de R de hasta 7,6 veces su valor de R de nivel inicial. En respuesta al tratamiento con una dosis de 1 mg/kg de ARC19499, que no corrigió el tiempo de hemorragia, el valor de R se redujo hasta 6,1 veces el valor de R de nivel inicial. El tratamiento de este mono con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg, que tampoco corrigieron el tiempo de hemorragia en este mono, redujo adicionalmente el valor de R ligeramente, hasta 5,8 veces el del nivel inicial. Una dosis adicional de ARC19499 1 mg/kg, que sí corrigió el tiempo de hemorragia, redujo el valor de R hasta 3 veces el valor de R de nivel inicial.

Tabla 29. Valores de R mediante TEG® en sangre completa en un mono cuyo tiempo de hemorragia se corrigió mediante tres dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 3)

Grupo 3: Valores de R mediante TEG® en sangre completa		
	Punto de tiempo	NHP0702073
	(min)	(min)
Nivel inicial	-10	3,9
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	29,5
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	23,6
12 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	239	22,5
12 min tras el tercer tratamiento con ARC19499	278	11,8

Los valores de R para el mono del grupo 4 se muestran en la tabla 30; los valores de R también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de las muestras de sangre en la figura 133. Este mono mostró, en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII, una prolongación de hasta 2,9 veces su valor de R de nivel inicial. En respuesta al tratamiento con una dosis de 1 mg/kg de ARC19499, que no corrigió el tiempo de hemorragia, el valor de R se redujo hasta 1,6 veces el valor de R de nivel inicial. El tratamiento de este mono con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg, que tampoco corrigieron el tiempo de hemorragia en este mono, redujo adicionalmente el valor de R ligeramente, hasta 1,5 veces el valor de R de nivel inicial. Una dosis adicional de ARC19499 1 mg/kg, que tampoco corrigió todavía el tiempo de hemorragia, redujo más el valor de R ligeramente hasta 1,2 veces el valor de R de nivel inicial. Una cuarta dosis de ARC19499 3 mg/kg tuvo poco efecto sobre el valor de R, que era ahora 1,1 veces el valor de R de nivel inicial antes del tratamiento. No pudieron realizarse evaluaciones adicionales del tiempo de hemorragia en este animal debido a la falta de suficiente vena disponible de acuerdo con la usada para las evaluaciones anteriores.

Tabla 30. Valores de R mediante TEG® en sangre completa en un mono cuyo tiempo de hemorragia no se corrigió mediante tres dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 4)

Grupo 4: Valores de R mediante TEG® en sangre completa		
	Punto de tiempo (min)	NHP0607367 (min)
Nivel inicial	-10	7,2
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	21,2
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	11,2
12 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	237	10,7
12 min tras el tercer tratamiento con ARC19499	264	8,8
12 min tras el cuarto tratamiento con ARC19499	296	8,1

También se analizó el estado de coagulación de plasma de macaco cangrejero usando el ensayo TEG® en plasma de las muestras de sangre con citrato. Las muestras de sangre completa con citrato se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el procesamiento del plasma. Se centrifugaron las muestras a 2.000x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el plasma y se almacenó inmediatamente a -80 °C hasta que se envió para el análisis. Antes del análisis, se descongelaron rápidamente las muestras de plasma a 37 °C. Para iniciar la reacción de coagulación, se añadieron 330 µl de plasma con citrato a una cubeta desechable (Haemonetics Corporation, Braintree, MA, n.º de catálogo 6211) que contenía 20 µl de 0,2 M (Haemonetics Corporation (Braintree, MA)) y 10 µl de TF (disolución final de 1:200000 a 37 °C). Se usó Innovin (Dade-Behring, Newark, DE) como fuente de factor tisular (TF), reconstituido en agua según la recomendación del fabricante, y se diluyó 1:5555 en solución salina al 0,9 % antes de su uso. Se almacenó Innovin de reserva reconstituido a 4 °C durante menos de 4 semanas. Se midió el tiempo hasta la formación de coágulo inicial (valor de R) usando el sistema Haemoscope TEG® 5000 (Haemonetics Corporation, Braintree, MA).

Los valores de R de grupo medios ($\pm$ EEM) de muestras de plasma de monos del grupo 1 (cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron con una dosis de ARC19499 1 mg/kg) se muestran en la tabla 31. Los valores de R de grupo medios también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de la muestra de plasma (figura 134). El tratamiento con Ac frente a FVIII dio como resultado una prolongación del valor de R medio de grupo de hasta aproximadamente 2,8 veces el valor de R medio de grupo en el nivel inicial. Aunque el tratamiento de los monos con ARC19499 1 mg/kg redujo el valor de R medio de grupo con respecto al obtenido tras el tratamiento con Ac frente a FVIII, este valor de R todavía fue de aproximadamente 1,9 veces el valor de R de nivel inicial medio de grupo. Los valores de R individuales para monos del grupo 1 se muestran en la tabla 32; los valores de R individuales también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de la muestra de plasma en la figura 135. Todos los monos en este grupo mostraron una prolongación de sus valores de R en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII en comparación con sus valores de R antes del tratamiento de nivel inicial (intervalo de 1,7 a 5,1 veces). Todos excepto uno de los monos en este grupo también mostraron una reducción de sus valores de R en respuesta a la administración de ARC19499 1 mg/kg en comparación con sus valores de R antes del tratamiento de nivel inicial (intervalo de 1,3 a 1,8 veces). Un mono, NHP0603477, mostró un aumento del 50 % en el valor de R en comparación con el valor de R tras la inyección de Ac frente a FVIII tras la administración de ARC19499 1 mg/kg; el análisis mediante TEG® en sangre completa había mostrado en cambio una disminución del 53 % en el valor de R en comparación con el valor de R tras la inyección de Ac frente a FVIII tras la administración de ARC19499 1 mg/kg. El análisis mediante TEG® en plasma de NHP0701565, cuyo análisis mediante TEG® en sangre completa había mostrado un ligero aumento en el valor de R en respuesta a la administración de ARC19499 1 mg/kg, fue realmente un 66 % inferior al valor de R tras la inyección de Ac frente a FVIII tras la administración de ARC19499 1 mg/kg.

Tabla 31. Valores de R medios mediante TEG® en plasma en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante una dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 1)

Grupo 1: Valores de R medios mediante TEG® en plasma			
	Punto de tiempo	Media	EEM
	(min)	(min)	(min)
Nivel inicial	-10	5,4	0,37
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	15	1,6
55 min tras el tratamiento con ARC19499	210	10	1,7

Tabla 32. Valores de R individuales mediante TEG® en plasma en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante una dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 1)

Grupo 1: Valores de R individuales mediante TEG® en plasma							
	Punto de tiempo	NHP 0703333	NHP 0704039	NHP 0701565	NHP 0604313	NHP 0703551	NHP 0603477
	(min)	(min)	(min)	(min)	(min)	(min)	(min)
Nivel inicial	-10	5,0	6,0	4,3	4,6	6,3	6,4
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	12,2	16,6	21,9	15,5	14,1	10,8
55 min tras el tratamiento con ARC19499	210	9,2	7,8	7,4	ns	ns	16,2

Los valores de R de grupo medios ($\pm$ EEM) de muestras de plasma de monos del grupo 2 (cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg) se muestran en la tabla 33. Los valores de R de grupo medios también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de las muestras de sangre en la figura 136. El tratamiento con el anticuerpo anti-FVIII dio como resultado una prolongación del valor de R medio de grupo de hasta aproximadamente 4,0 veces el valor de R medio de grupo en el nivel inicial. En respuesta al tratamiento con una dosis de 1 mg/kg de ARC19499, que no corrigió el tiempo de hemorragia, el valor de R medio de grupo se redujo hasta aproximadamente 2,2 veces el valor de R medio de grupo de nivel inicial. El tratamiento de los monos con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg, que sí corrigió el tiempo de hemorragia en este grupo, no redujo significativamente de manera adicional el valor de R medio de grupo con respecto al obtenido tras el tratamiento con Ac frente a FVIII. Los valores de R individuales para monos del grupo 2 se muestran en la tabla 34; los valores de R individuales también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de la muestra de sangre en la figura 137. Todos los monos en este grupo mostraron una prolongación de sus valores de R en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII en comparación con sus valores de R antes del tratamiento de nivel inicial en el nivel inicial (intervalo de 1,1 a 6,4 veces). En respuesta al tratamiento con una dosis de 1 mg/kg de ARC19499, que no corrigió los tiempos de hemorragia, se redujeron los valores de R en plasma de todos los monos en este grupo con respecto al valor de R medio de grupo de nivel inicial (intervalo de 0,5 a 4,5 veces). El tratamiento de los monos con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg, que sí corrigió todos los tiempos de hemorragia en este grupo, produjo valores de R sin cambios o reducidos adicionalmente, aunque en dos monos los valores de R fueron todavía superiores que los de en el nivel inicial antes del tratamiento (intervalo de 0,5 a 3,2 veces).

Tabla 33. Valores de R medios mediante TEG® en plasma en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante dos dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 2)

Grupo 2: Valores de R medios mediante TEG® en plasma			
	Punto de tiempo	Media	EEM
	(min)	(min)	(min)
Nivel inicial	-10	5,8	0,6
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	23	6,5
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	13	4,5
12 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	237	12	3,7

Tabla 34. Valores de R individuales mediante TEG® en plasma en monos cuyos tiempos de hemorragia se corrigieron mediante dos dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 2)

Grupo 2: Valores de R individuales mediante TEG® en plasma					
	Punto de tiempo	NHP 0610301	NHP 0702277	NHP 0611655	NHP 0511011
	(min)	(min)	(min)	(min)	(min)
Nivel inicial	-10	4,6	7,2	5,3	6,0
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	15,4	8,1	33,9	33,7
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	7,6	3,5	23,7	16,8
12 min tras el tratamiento con ARC19499	237	ns	3,9	17,2	16,5

Los valores de R de las muestras de plasma del mono del grupo 3 se muestran en la tabla 35; los valores de R

también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de las muestras de sangre en la figura 138. Este mono mostró, en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII, una prolongación de su valor de R de hasta 3,5 veces su valor de R de nivel inicial. En respuesta al tratamiento con una dosis de 1 mg/kg de ARC19499, que no corrigió el tiempo de hemorragia, el valor de R se redujo hasta 1,3 veces el valor de R de nivel inicial. El tratamiento de este mono con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg, que tampoco corrigieron el tiempo de hemorragia en este mono, redujo adicionalmente el valor de R hasta 1,1 veces el del nivel inicial. Una dosis adicional de ARC19499 1 mg/kg, que sí corrigió el tiempo de hemorragia, redujo el valor de R hasta 0,9 veces el valor de R de nivel inicial.

Tabla 35. Valores de R mediante TEG® en plasma en un mono cuyo tiempo de hemorragia se corrigió mediante tres dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 3)

Grupo 3: Valores de R mediante TEG® en plasma		
	Punto de tiempo	NHP0702073
	(min)	(min)
Nivel inicial	-10	4,7
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	16,4
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	6,2
12 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	239	5,2
12 min tras el tercer tratamiento con ARC19499	278	4,4

Los valores de R de muestras de plasma del mono del grupo 4 se muestran en la tabla 36; los valores de R también se representan gráficamente frente a los puntos de tiempo de las muestras de sangre en la figura 139. Este mono mostró, en respuesta a la administración de Ac frente a FVIII, una prolongación de hasta 2,9 veces su valor de R de nivel inicial. En respuesta al tratamiento con una dosis de 1 mg/kg de ARC19499, que no corrigió el tiempo de hemorragia, el valor de R se redujo con respecto al valor de R de nivel inicial en hasta 1,1 veces el valor de R de nivel inicial. El plasma de sangre extraída tras el tratamiento de este mono con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg, que tampoco corrigieron el tiempo de hemorragia en este mono, mostró un valor de R ligeramente superior de 1,2 veces el valor de R de nivel inicial. Una dosis adicional de ARC19499 1 mg/kg, que tampoco corrigió todavía el tiempo de hemorragia, redujo más el valor de R ligeramente hasta 1,0 veces el valor de R de nivel inicial. Una cuarta dosis de ARC19499 3 mg/kg redujo el valor de R hasta por debajo del nivel inicial antes del tratamiento (0,9 veces el valor de R de nivel inicial antes del tratamiento). No pudieron realizarse evaluaciones adicionales del tiempo de hemorragia en este animal debido a la falta de suficiente vena disponible de acuerdo con la usada para las evaluaciones anteriores.

Tabla 36. Valores de R mediante TEG® en plasma en un mono cuyo tiempo de hemorragia no se corrigió mediante tres dosis de ARC19499 1 mg/kg (grupo 4)

Grupo 4: Valores de R mediante TEG® en plasma		
	Punto de tiempo	NHP0607367
	(min)	(min)
Nivel inicial	-10	6,4
2 h tras el tratamiento con Ac frente a FVIII	120	18,5
55 min tras el primer tratamiento con ARC19499	210	6,8
12 min tras el segundo tratamiento con ARC19499	237	7,5
12 min tras el tercer tratamiento con ARC19499	264	6,2
12 min tras el cuarto tratamiento con ARC19499	296	5,8

El ejemplo anterior muestra que los monos tratados con el Ac frente a FVIII mostraron hemorragia prolongada tras la punción de la vena safena, una observación que concuerda con la hemorragia prolongada que es la característica distintiva de la hemofilia. En la mayoría de los monos sometidos a prueba en este estudio (11 de 12), el tratamiento con hasta ARC19499 3 mg/kg corrigió este tiempo de hemorragia prolongado. Seis de los monos solo requirieron una dosis de ARC19499 1 mg/kg para mostrar esta corrección; el tiempo de hemorragia en otros cuatro monos se corrigió con dos dosis de ARC19499 1 mg/kg. Los valores de R en el análisis de TEG® de la sangre completa de estos monos mostraron la elevación esperada tras la administración de Ac frente a FVIII; esta elevación se redujo hacia los niveles iniciales tras el tratamiento con ARC19499; se observó un patrón similar en el análisis del plasma de estas muestras de sangre. Estos datos muestran que ARC19499 puede corregir la hemorragia prolongada en un modelo de hemofilia inducida, lo que apoya la posible utilidad clínica de ARC19499 como agente terapéutico satisfactorio en el tratamiento de pacientes con hemofilia A con inhibidor y sin inhibidor.

Ejemplo 34

Este ejemplo es una evaluación de sustituciones tolerada y no toleradas en ARC17480 a través de química médica de aptámeros.

Se generaron moléculas para realizar las pruebas con modificaciones en la posición 2' o dentro de la estructura

principal de fosfato de residuos en ARC17480, tal como se muestra en la tabla 37 a continuación y en las figuras 140 y 141. Cada residuo 2'-desoxi individual en ARC17480 se reemplazó por el residuo que contenía 2'-metoxi o 2'-fluoro correspondiente, dando como resultado ARC18538-ARC18541 y ARC19493-ARC19496, respectivamente (figura 140). Adicionalmente, se generaron algunas moléculas con múltiples residuos de 2'-desoxi a 2'-metoxi y/o de 2'-desoxi a 2'-fluoro en los cuatro residuos de desoxicitidina en ARC17480 en las posiciones 9, 14, 16 y 25, dando como resultado ARC18545, ARC18546, ARC18549, ARC19476, ARC19477, ARC19478, ARC19484, ARC19490 y ARC19491 (figura 140). Cada residuo 2'-metoxi individual en ARC17480 se reemplazó por el residuo 2'-desoxi correspondiente, reemplazándose los residuos de 2'-metoxiuridina tanto con residuos de 2'-desoxitimidina como con residuos de 2'-desoxiuridina, dando como resultado ARC19448-ARC19475 y ARC33867-ARC33877 (figura 140). El fosfato entre cada par de nucleótidos en ARC17480 se reemplazó individualmente con un fosforotioato, dando como resultado ARC19416-ARC19447 (figura 141).

Se sometieron a ensayo las moléculas de ARC17480 para determinar la unión y la función. Los ensayos usados para esta evaluación fueron el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT), un ensayo de competencia de unión de transferencia puntual y un ensayo de actividad de FXa. Los resultados de estos ensayos se resumen en la tabla 37 y se representan en la figura 142. Se consideró que se toleraba la actividad de una sustitución si cumplía los criterios de al menos dos de los tres ensayos que se llevaron a cabo. Las sustituciones que se toleraron ("sí") y que no se toleraron ("no") se identifican en la tabla 37. Los detalles experimentales y los criterios usados para cada ensayo se describen en los siguientes párrafos.

Se evaluó la actividad inhibidora de TFPI de cada molécula en el ensayo de CAT en plasma de hemofilia A mezclado a una concentración de aptámero de 500 nM, 166,67 nM, 55,56 nM, 18,52 nM, 6,17 nM y 2,08 nM. Se incluyó ARC17480 en cada experimento como control. Para cada molécula, se usaron para el análisis el potencial de trombina endógeno (ETP) y los valores de trombina pico a cada concentración de aptámero. Se restó el valor de ETP o trombina pico para plasma de hemofilia A solo del valor correspondiente en presencia de aptámero para cada molécula a cada concentración. Entonces, se representaron gráficamente los valores pico y de ETP corregidos en función de la concentración de aptámero y se ajustaron a la ecuación $y = (\text{máx}/(1 + \text{Cl}_{50}/x)) + \text{int}$, donde y = ETP o trombina pico, x = concentración de aptámero, máx = el ETP máximo o trombina pico, e int = la ordenada en el origen, para generar un valor de Cl_{50} tanto para ETP como para la trombina pico. La Cl_{50} de cada aptámero se comparó con la Cl_{50} de ARC17480 que se evaluó en el mismo experimento. Una sustitución se consideró tolerada en el ensayo de CAT si tanto el ETP como la Cl_{50} de la trombina pico de esa molécula fueron no más de 5 veces mayores que los de ARC17480 evaluado en el mismo experimento. Las sustituciones toleradas se indican en la tabla 37 que cumplen los criterios del ensayo ("sí") o que no cumplen los criterios del ensayo ("no").

Se evaluó cada molécula para determinar la unión al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) en un ensayo de competencia de unión. Para estos experimentos, se incubó TFPI humano 10 nM (American Diagnostica, Stamford, CT, n.º de catálogo 4500PC) con cantidades traza de ARC17480 radiomarcado y 5000 nM, 1666,67 nM, 555,56 nM, 185,19 nM, 61,73 nM, 20,58 nM, 6,86 nM, 2,29 nM, 0,76 nM o 0,25 nM de un aptámero competidor no marcado. Se incluyó ARC17480 como competidor en cada experimento como control. Para cada molécula, se usó el porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido a cada concentración de aptámero competidor para el análisis. El porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido se representó gráficamente en función de la concentración de aptámero y se ajustó a la ecuación $y = (\text{máx}/(1 + x/\text{Cl}_{50})) + \text{int}$, donde y = el porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido, x = la concentración de aptámero, máx = el ARC17480 radiomarcado unido máximo, e int = la ordenada en el origen, para generar un valor de Cl_{50} para competencia de unión. La Cl_{50} de cada aptámero se comparó con la Cl_{50} de ARC17480 que se evaluó en el mismo experimento. Una sustitución se consideró tolerada en el ensayo de competencia de unión si la Cl_{50} de esa molécula fue no más de 5 veces mayor que la de ARC17480 evaluado en el mismo experimento. Las sustituciones toleradas se indican en la tabla 37 que cumplen los criterios del ensayo ("sí") o que no cumplen los criterios del ensayo ("no").

Se evaluó cada molécula para determinar la inhibición de TFPI en un ensayo de actividad del factor Xa (FXa). Se midió la capacidad de FXa para escindir un sustrato cromogénico en presencia y ausencia de TFPI, con o sin la adición de aptámero. Para estos experimentos, se incubó FXa humano 2 nM con TFPI humano 8 nM. Entonces, se añadieron sustrato cromogénico y aptámeros 500 μM y se midió la escisión por FXa del sustrato mediante absorbancia a 405 nm (A_{405}) en función del tiempo. Se sometieron a prueba los aptámeros a concentraciones de 500 nM, 125 nM, 31,25 nM, 7,81 nM, 1,95 nM y 0,49 nM. Se incluyó ARC17480 como control en cada experimento. Para cada concentración de aptámero, se representó gráficamente A_{405} en función del tiempo y se ajustó la región lineal de cada curva a la ecuación $y = mx + b$, donde y = A_{405} , x = la concentración de aptámero, m = la velocidad de escisión de sustrato, y b = la ordenada en el origen, para generar una velocidad de escisión de sustrato por FXa. La velocidad de escisión de sustrato por FXa en presencia de TFPI y en ausencia de aptámero se restó del valor correspondiente en presencia tanto de TFPI como de aptámero para cada molécula a cada concentración. Entonces, se representaron gráficamente las velocidades corregidas en función de la concentración de aptámero y se ajustaron a la ecuación $y = (V_{\text{máx}}/(1 + \text{Cl}_{50}/x))$, donde y = la velocidad de escisión de sustrato, x = concentración de aptámero, y $V_{\text{máx}}$ = la velocidad máxima de escisión de sustrato, para generar una Cl_{50} y un valor máximo ($V_{\text{máx}}$). Los valores de Cl_{50} y $V_{\text{máx}}$ de cada aptámero se compararon con los valores de Cl_{50} y $V_{\text{máx}}$ de ARC17480 que se evaluó en el mismo experimento. Una sustitución se consideró tolerada en el ensayo de actividad de FXa si la Cl_{50} de esa molécula no fue más de 5 veces mayor que la de ARC17480 evaluado en el mismo experimento y el valor de $V_{\text{máx}}$

fue no menos del 80 % del valor de $V_{\text{máx}}$ del ARC17480 evaluado en el mismo experimento. Las sustituciones toleradas se indican en la tabla 37 que cumplen los criterios del ensayo ("sí") o que no cumplen los criterios del ensayo ("no").

- 5 Este ejemplo demuestra que se toleran múltiples sustituciones individuales en 2' en ARC17480 para la unión y la actividad, y que también se toleran algunas combinaciones de sustituciones en 2' (tabla 37 y figura 142). Este ejemplo también demuestra que se tolera una sustitución de fosforotioato entre cada par de nucleótidos en ARC17480 (tabla 37). Es probable que se toleren combinaciones adicionales de sustituciones en 2' y/o fosforotioato en ARC17480 para la unión y la actividad.

10

Tabla 37: Sustituciones toleradas y no toleradas en ARC17480

SEQ ID NO:	N.º de ARC	Secuencia (5' → 3') (3T= dT invertida; s=fosforotioato; mN=residuo que contiene 2'-metoxi-; dN=residuo con desoxi-; fN=residuo que contiene 2'-fluoro-)	¿Se cumplen los criterios?			Sustitución/sustituciones tolerada(s)
			Ensayo de CAT	Ensayo de unión-competencia	Ensayo de actividad de FXa	
19	18538	mGmGmAmAmUmAmUmAmCmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	NO	NO	NO	NO
20	18539	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmUmUmGmGmCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	SI	SI	SI	SI
21	18540	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmUmUmGmGmCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	SI	SI	NO	SI
22	18541	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGmCmGmUmAmUmAmUmA3T	SI	SI	NO	SI
23	19493	mGmGmAmAmUmAmUmAfCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	NO	NO	NO	NO
24	19494	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmUmUmGmGfCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	SI	SI	SI	SI
25	19495	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUfCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	SI	SI	SI	SI

26	19496	mGmGmAmaUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGfCmGmUmAmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
27	19448	dGmGmAmaUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
28	19449	mGdGmAmaUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
29	19450	mGmGdAmAmUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
30	19451	mGmGmAdAmUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
31	19452	mGmGmAmaAdTmAmaUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
32	19453	mGmGmAmaUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
33	19454	mGmGmAmaUmAdTmAmaUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
34	19455	mGmGmAmaUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl

35	19456	mGmGmAmAmUmAmUmAdCdTm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	NO	Sl	NO	NO
36	19457	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmUd TmGmGdCmUdCmGmUmUmAmG mGmUmGdCmGmUmAmUmAmU mA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
37	19458	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUdGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
38	19459	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGdGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
39	19460	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCdTdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
40	19461	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCdGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
41	19462	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGdTmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	NO	Sl	NO	NO
42	19463	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUdTmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
43	19464	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUdAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl

44	19465	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmAd GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
45	19466	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGdGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
46	19467	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGdTmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
47	19468	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUdGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
48	19469	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	NO	NO	Sl	Sl	NO
49	19470	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGdTmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
50	19471	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUdAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
51	19472	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAdTmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
52	19473	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUdA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl

53	19474	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA dTmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
54	19475	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUdA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
55	33867	mGmGmAmAdUmAmUmAdCmUm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
56	33868	mGmGmAmAmUmAdUmAdCmUm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
57	33869	mGmGmAmAmUmAmUmAdCdUm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	NO	NO	NO	NO
58	33870	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmUd UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	NO	Sl	Sl
59	33871	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCdUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
60	33872	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGdUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
61	33873	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUdUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl

62	33874	mGmGmAmaUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGdUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
63	33875	mGmGmAmaUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGdUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
64	33876	mGmGmAmaUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAdUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
65	33877	mGmGmAmaUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA dUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
66	18545	mGmGmAmaUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUmCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	NO	Sl	Sl
8	18546	mGmGmAmaUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGmCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
67	18549	mGmGmAmaUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUmCmGmUmUmA mGmGmUmGmCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	NO	Sl	Sl
68	19476	mGmGmAmaUmAmUmAfCmUm UmGmGmCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	NO	Sl	Sl	Sl
69	19477	mGmGmAmaUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUfCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl

70	19478	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGfCmGmUmAmUmA mUmA3T	NO	SI	SI	SI
71	19484	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGfCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGmCmGmUmAmUmAm UmA3T	SI	NO	SI	SI
72	19490	mGmGmAmAmUmAmUmAfCmUm UmGmGmCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGmCmGmUmAmUmAm UmA3T	SI	SI	NO	SI
73	19491	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGmCmUfCmGmUmUmA mGmGmUmGmCmGmUmAmUmA mUmA3T	SI	SI	SI	SI
74	19416	mGsmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	SI	SI	SI	SI
75	19417	mGmGsmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	SI	SI	SI	SI
76	19418	mGmGmAsmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	SI	SI	SI	SI
77	19419	mGmGmAmAsmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	SI	SI	SI	SI
78	19420	mGmGmAmAmUsmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	SI	SI	SI	SI

79	19421	mGmGmAmAmUmAsmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
80	19422	mGmGmAmAmUmAmUsmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	NO	Sl
81	19423	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
82	19424	mGmGmAmAmUmAmUmAdCsmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
83	19425	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmUs mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
84	19426	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUsmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
85	19427	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGsmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
86	19428	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGsdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
87	19429	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCsmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl

88	19430	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
89	19431	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCsmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
90	19432	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGsmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
91	19433	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUsmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
92	19434	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUsmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
93	19435	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmAs mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
94	19436	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGsmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
95	19437	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGsmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
96	19438	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUsmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl

97	19439	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGsdCmGmUmAmUm AmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
98	19440	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCsmGmUmAmUm AmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
99	19441	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGsmUmAmUm AmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
100	19442	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUsmAmUm AmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
101	19443	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAsmUm AmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
102	19444	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUsm AmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
103	19445	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA smUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
104	19446	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUsmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
105	19447	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmU mUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmAs3T	Sl	Sl	Sl	Sl

Ejemplo 35

Este ejemplo es una evaluación de delecciones toleradas y no toleradas en ARC17480.

- 5 Se generaron moléculas para realizar las pruebas con residuos individuales o múltiples con delección en la secuencia de ARC17480, tal como se muestra en la tabla 38 a continuación y en la figura 143. Se delecionó cada residuo individual en ARC17480 cada vez, dando como resultado ARC32301, ARC33120-ARC33143 y ARC18555. En los casos en que dos nucleótidos adyacentes eran idénticos, también se generó la doble delección correspondiente, dando como resultado ARC32302 y ARC33144-ARC33148. Adicionalmente, se generaron moléculas con múltiples delecciones, dando como resultado ARC32303, ARC32305, ARC32306, ARC32307, ARC33889, ARC33890, ARC33891, ARC33895, ARC33900 y ARC33907.

- 15 Se sometieron a ensayo moléculas de ARC17480 con delecciones para determinar la unión y la función. Los ensayos usados para esta evaluación fueron el ensayo de trombograma automatizado calibrado (CAT), un ensayo de unión de transferencia puntual-competencia y un ensayo de actividad de FXa. Los resultados de estos ensayos se resumen en la tabla 38 y en la figura 144. Una sustitución se consideró tolerada en cuanto a la actividad si cumplía los criterios de al menos dos de los tres ensayos que se llevaron a cabo. Las sustituciones que se toleraron ("sí") y no se toleraron ("no") se definen en la tabla 38. Los detalles experimentales y los criterios usados para cada ensayo se describen en los siguientes párrafos.

- 20 Se evaluó la actividad inhibidora de TFPI de cada molécula en el ensayo de CAT en plasma de hemofilia A mezclado a una concentración de aptámero de 500 nM, 166,67 nM, 55,56 nM, 18,52 nM, 6,17 nM y 2,08 nM. Se incluyó ARC17480 en cada experimento como control. Para cada molécula, se usaron para el análisis los valores de potencial de trombina endógeno (ETP) y trombina pico a cada concentración de aptámero. Se restó el valor de ETP o trombina pico para plasma de hemofilia A solo del valor correspondiente en presencia de aptámero para cada molécula a cada concentración. Entonces, se representaron gráficamente los valores pico y de ETP corregidos en función de la concentración de aptámero y se ajustaron a la ecuación $y = (\text{máx}/(1 + \text{Cl}_{50}/x)) + \text{int}$, donde y = ETP o trombina pico, x = concentración de aptámero, máx = el ETP máximo o trombina pico, e int = la ordenada en el origen, para generar un valor de Cl_{50} tanto para ETP como para la trombina pico. La Cl_{50} de cada aptámero se comparó con la Cl_{50} de ARC17480 que se evaluó en el mismo experimento. Una sustitución se consideró tolerada en el ensayo de CAT si tanto el ETP como la Cl_{50} de la trombina pico de esa molécula fueron no más de 5 veces mayores que los de ARC17480 evaluado en el mismo experimento. Las sustituciones toleradas se indican en la tabla 38 que cumplen los criterios del ensayo ("sí") o que no cumplen los criterios del ensayo ("no").

- 35 Se evaluó cada molécula para determinar la unión al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) en un ensayo de competencia de unión. Para estos experimentos, se incubó TFPI 10 nM humano (American Diagnostica, Stamford, CT, n.º de catálogo 4500PC) con cantidades traza de ARC17480 radiomarcado y 5000 nM, 1666,67 nM, 555,56 nM, 185,19 nM, 61,73 nM, 20,58 nM, 6,86 nM, 2,29 nM, 0,76 nM o 0,25 nM de aptámero competidor no marcado. Se incluyó ARC17480 como competidor en cada experimento como control. Para cada molécula, se usó el porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido a cada concentración de aptámero competidor para el análisis. El porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido se representó gráficamente en función de la concentración de aptámero y se ajustó a la ecuación $y = (\text{máx}/(1 + x/\text{Cl}_{50})) + \text{int}$, donde y = el porcentaje de ARC17480 radiomarcado unido, x = la concentración de aptámero, máx = el ARC17480 radiomarcado máximo unido, e int = la ordenada en el origen, para generar un valor de Cl_{50} para competencia de unión. La Cl_{50} de cada aptámero se comparó con la Cl_{50} de ARC17480 que se evaluó en el mismo experimento. Una sustitución se consideró tolerada en el ensayo de competencia de unión si la Cl_{50} de esa molécula no fue más de 5 veces mayor que la de ARC17480 evaluado en el mismo experimento. Las sustituciones toleradas se indican en la tabla 38 que cumplen los criterios del ensayo ("sí") o que no cumplen los criterios del ensayo ("no").

- 50 Se evaluó cada molécula para determinar inhibición de TFPI en un ensayo de actividad del factor Xa (FXa). Se midió la capacidad de FXa para escindir un sustrato cromogénico en presencia y ausencia de TFPI, con o sin la adición de aptámero. Para estos experimentos, se incubó FXa humano 2 nM con TFPI humano 8 nM. Entonces, se añadieron sustrato cromogénico y aptámeros 500 μM y se midió la escisión por FXa del sustrato mediante absorbancia a 405 nm (A_{405}) en función del tiempo. Se sometieron a prueba los aptámeros a concentraciones de 500 nM, 125 nM, 31,25 nM, 7,81 nM, 1,95 nM y 0,49 nM. Se incluyó ARC17480 como control en cada experimento. Para cada concentración de aptámero, se representó gráficamente A_{405} en función del tiempo y se ajustó la región lineal de cada curva a la ecuación $y = mx + b$, donde $y = A_{405}$, x = la concentración de aptámero, m = la velocidad de escisión de sustrato, y b = la ordenada en el origen, para generar una velocidad de escisión de sustrato por FXa. La velocidad de escisión de sustrato por FXa en presencia de TFPI y en ausencia de aptámero se restó del valor correspondiente en presencia tanto de TFPI como de aptámero para cada molécula a cada concentración. Entonces, se representaron gráficamente las velocidades corregidas en función de la concentración de aptámero y se ajustaron a la ecuación $y = (V_{\text{máx}}/(1 + \text{Cl}_{50}/x))$, donde y = la velocidad de escisión de sustrato, x = concentración de aptámero, y $V_{\text{máx}}$ = la velocidad máxima de escisión de sustrato, para generar una Cl_{50} y un valor máximo ($V_{\text{máx}}$). Los valores de Cl_{50} y $V_{\text{máx}}$ de cada aptámero se compararon con los valores de Cl_{50} y $V_{\text{máx}}$ de ARC17480 que se evaluó en el mismo experimento. Una sustitución se consideró tolerada en el ensayo de actividad de FXa si la Cl_{50} de esa molécula no fue más de 5 veces mayor que la de ARC17480 evaluado en el mismo experimento y el valor de $V_{\text{máx}}$

fue no menos del 80 % del valor de $V_{\text{máx}}$ del ARC17480 evaluado en el mismo experimento. Las sustituciones toleradas se indican en la tabla 38 que cumplen los criterios del ensayo ("sí") o que no cumplen los criterios del ensayo ("no").

- 5 Este ejemplo demuestra que se toleran múltiples deleciones individuales en ARC17480 para la unión y la actividad, y que también se toleran algunas combinaciones de deleciones (tabla 38 y figura 144). ARC33889 y ARC33895 toleran cada uno un total de siete deleciones en sus extremos 5' y 3', dando como resultado moléculas de núcleo que tienen veinticinco nucleótidos de longitud. Pueden tolerarse combinaciones adicionales de deleciones en ARC17480 para la unión y la actividad, con o sin cambios adicionales en la molécula.

10

Tabla 38: Deleciones toleradas y no toleradas en ARC17480

SEQ ID NO:	N.º de ARC	Secuencia (5' → 3') (3T=dT invertida; mN=residuo que contiene 2'-metoxi-; dN= residuo con desoxi-)	¿Se cumplen los criterios?			Sustitución/sustituciones tolerada(s)
			Ensayo de CAT	Ensayo de unión-competencia	Ensayo de actividad de FXa	
106	32301	mGmAmAmUmAmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	SI	SI	SI	SI
107	33120	mGmGmAmUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	SI	SI	SI	SI
108	33121	mGmGmAmAmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	SI	SI	SI	SI
109	33122	mGmGmAmAmUmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	NO	SI	SI	SI
110	33123	mGmGmAmAmUmAmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	NO	NO	NO	NO
111	33124	mGmGmAmAmUmAmUdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	NO	NO	NO	NO
112	33125	mGmGmAmAmUmAmUmAmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUmA3T	NO	NO	NO	NO

113	33126	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmGmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	NO	NO	NO	NO
114	33127	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGdCmUdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	NO	NO	NO	NO
115	33128	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	NO	NO	NO	NO
116	33129	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmGmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	NO	NO	NO	NO
117	33130	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	NO	NO	NO	NO
118	33131	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmUmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	NO	NO	NO	NO
119	33132	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmAm GmGmUmGdCmGmUmAmUmA mUmA3T	NO	NO	SI	NO
120	33133	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mGmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	NO	NO	NO	NO

121	33134	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mAmGmUmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	NO	NO	NO	NO
122	33135	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mAmGmGmGdCmGmUmAmUm AmUmA3T	NO	NO	NO	NO
123	33136	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mAmGmGmUdCmGmUmAmUm AmUmA3T	NO	NO	NO	NO
124	33137	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mAmGmGmUmGmGmUmAmUm AmUmA3T	NO	NO	NO	NO
125	33138	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mAmGmGmUmGdCmUmAmUm AmUmA3T	NO	NO	NO	NO
126	33139	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mAmGmGmUmGdCmGmAmUm AmUmA3T	NO	NO	NO	NO
127	33140	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mAmGmGmUmGdCmGmUmUm AmUmA3T	NO	NO	NO	NO
128	33141	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mAmGmGmUmGdCmGmUmAm AmUmA3T	NO	SI	SI	SI

129	33142	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mAmGmGmUmGdCmGmUmAm UmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
130	33143	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mAmGmGmUmGdCmGmUmAm UmAmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
131	18555	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmUmU mAmGmGmUmGdCmGmUmAm UmAmU3T	Sl	Sl	Sl	Sl
132	32302	mAmAmUmAmUmAdCmUmUmG mGdCmUdCmGmUmUmAmGm GmUmGdCmGmUmAmUmAmU mA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
133	33144	mGmGmUmAmUmAdCmUmUm GmGdCmUdCmGmUmUmAmG mGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
134	33145	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm GmGdCmUdCmGmUmUmAmG mGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	NO	NO	NO	NO
135	33146	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUdCmUdCmGmUmUmAmGm GmUmGdCmGmUmAmUmAmU mA3T	NO	NO	NO	NO
136	33147	mGmGmAmAmUmAmUmAdCm UmUmGmGdCmUdCmGmAmG mGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	NO	NO	NO	NO

137	33148	mGmGmAmAmUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmUmAmGdCmGmUmAmUmA3T	NO	NO	NO	NO
138	32303	mAmUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
139	32305	mGmAmAmUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
140	32306	mAmAmUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
141	32307	mAmUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
142	33889	mUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmA3T	Sl	NO	Sl	Sl
143	33890	mAmUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
144	33891	mUmAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
145	33895	mAmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl
146	33900	mUmUmAdCmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmAmGmGmUmGdCmGmUmAmUmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl

147	33907	mGmGmAmAmUmAdCmUmUm GmGdCmUdCmGmUmUmAmG mGmUmGdCmGmUmAmUmAm UmA3T	Sl	Sl	Sl	Sl	Sl
-----	-------	--	----	----	----	----	----

Ejemplo 36

Este ejemplo demuestra que derivados truncados en 3' de ARC19499 tienen actividad funcional en el ensayo de CAT.

ARC21383, ARC21385, ARC21387 y ARC21389 tienen delecciones individuales sucesivas en su extremo 3' en relación con ARC19499 (tabla 39). Estas moléculas se someten a pegilación en sus extremos 5' con un PEG de 40 kDa. Se añadieron estas moléculas a plasma de hemofilia A a diferentes concentraciones (300 nM - 1,2 nM) y se midió la generación de trombina. Se usó ARC19499 como control en el experimento. Estas moléculas truncadas en 3' tenían todas actividad en el ensayo de CAT que era similar a la observada con ARC19499, con respecto tanto al potencial de trombina endógeno (ETP; figura 145A) como a la trombina pico (figura 145B).

Este ejemplo demuestra que ARC19499 pueden truncarse retirando 3T en 3' y los tres nucleótidos de núcleo del extremo 3' todavía conservan actividad en el ensayo de CAT que es similar a la de la molécula ARC19499 original.

Tabla 39: Versiones truncadas en 3 de ARC19499

SEQ ID NO:	N.º de ARC	Secuencia (5' → 3') (mN=residuo que contiene 2'-metoxi-; dN=residuo con desoxi-; nh=ligador de amina; PEG40K=PEG de 40 kDa)
148	21383	PEG40KnhmGmGmAmAmUmAmUmAd CmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmUm A
149	21385	PEG40KnhmGmGmAmAmUmAmUmAd CmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmAmU
150	21387	PEG40KnhmGmGmAmAmUmAmUmAd CmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmUmA
151	21389	PEG40KnhmGmGmAmAmUmAmUmAd CmUmUmGmGdCmUdCmGmUmUmA mGmGmUmGdCmGmUmAmU

Ejemplo 37

Este ejemplo describe una estrategia para identificar aptámeros que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Para estos experimentos, se usa una proteína o péptido TFPI parcial que comprende la región de TFPI que va a seleccionarse como diana como diana de selección. Puede usarse cualquier parte de la proteína TFPI para este tipo de experimento. Por ejemplo, una proteína TFPI que solo contiene los dominios K3 y C-terminal de TFPI de longitud completa (K3-C de TFPI; aminoácidos 182-276) es la diana para la selección. Se incubaba una mezcla de ácidos nucleicos con K3-C de TFPI para permitir que se produzca la unión, se divide la mezcla para separar ácidos nucleicos unidos de ácidos nucleicos no unidos, y se eluyen los ácidos nucleicos unidos de la proteína y se amplifican. Este procedimiento se repite opcionalmente durante múltiples ciclos hasta que se identifica un aptámero. Para algunos ciclos, se usa TFPI de longitud completa como la diana para garantizar que el aptámero se une a la región K3-C-terminal de la proteína en el contexto de la proteína de longitud completa. Estos experimentos dan como resultado la identificación de aptámeros de unión a TFPI cuyo epítipo de unión está contenido, por ejemplo, dentro de la región K3-C-terminal de la proteína.

Ejemplo 38

Este ejemplo describe una estrategia para identificar aptámeros que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Para estos experimentos, se usa TFPI de longitud completa como diana de selección y se usa una parte de TFPI o un ligando que se une a TFPI para eluir aptámeros que se unen a una parte de la proteína TFPI. También podría usarse una proteína o péptido que contiene solo una parte de TFPI como la diana de selección. Por ejemplo, se usa un péptido que comprende los aminoácidos 150-190 de TFPI para la elución. Se incubaba una mezcla de ácidos nucleicos con TFPI de longitud completa para permitir que se produzca la unión, se divide la mezcla para separar los ácidos nucleicos unidos de

ácidos nucleicos no unidos, se eluyen los ácidos nucleicos unidos de la proteína mediante incubación con el péptido de 150-190 de TFPI, y se amplifica. Se repite este procedimiento durante múltiples ciclos hasta que se identifica un aptámero. Estos experimentos dan como resultado la identificación de aptámeros de unión a TFPI cuyo epítipo de unión contiene, por ejemplo, toda o parte de la región de 150-190 de TFPI.

Ejemplo 39

Este ejemplo describe una estrategia para identificar aptámeros que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Para estos experimentos, se usa TFPI de longitud completa como diana de selección y se incluye un ligando que se une a TFPI en la selección para bloquear que los epítipos se unan al aptámero para dirigir la unión del aptámero a sitios alternativos en la proteína. También podría usarse una proteína o péptido que contiene solo una parte de TFPI como diana de selección. El ligando de bloqueo se incluye en la etapa de selección y/o en la etapa de división como método de captura o como reactivo de lavado. Por ejemplo, se incluye un anticuerpo que se une al extremo C-terminal de TFPI en la selección. Se incuba una mezcla de ácidos nucleicos con TFPI en presencia del anticuerpo para permitir que se produzca la unión, se divide la mezcla para separar los ácidos nucleicos unidos de los ácidos nucleicos no unidos, y se eluyen los ácidos nucleicos unidos de la proteína y se amplifican. Se repite este procedimiento durante múltiples ciclos hasta que se identifica un aptámero. Algunos ciclos incluyen el anticuerpo en la disolución de lavado durante la etapa de división y algunos ciclos usan el anticuerpo como método de división para capturar complejos de TFPI-aptámero, conjuntamente con o en lugar de la inclusión del anticuerpo en la etapa de unión. Estos experimentos dan como resultado la identificación de aptámeros de unión a TFPI cuyo epítipo de unión no está contenido, por ejemplo, dentro de la región de unión del anticuerpo en el extremo C-terminal de TFPI.

Ejemplo 40

Este ejemplo describe una estrategia para identificar aptámeros que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Para estos experimentos, se usa TFPI de longitud completa como diana de selección y se emplea una etapa de división que separa aptámeros con una propiedad funcional deseada de ácidos nucleicos que no tienen esa propiedad funcional. También podría usarse una proteína o péptido que contiene solo una parte de TFPI como diana de selección. Por ejemplo, la propiedad funcional deseada del aptámero es la inhibición de la interacción de TFPI con el factor Xa (FXa). Para estos experimentos, se incuba una mezcla de ácidos nucleicos con TFPI en condiciones que permiten la unión y luego se divide para separar los ácidos nucleicos no unidos de los aptámeros que están unidos a TFPI. Entonces se incuban los aptámeros unidos a TFPI con FXa que está unido a una placa hidrófoba. El TFPI libre y el TFPI unido con aptámeros que no interfiere con la interacción TFPI-FXa se une a FXa en la placa, mientras que el TFPI unido con aptámeros que no interfiere con la interacción TFPI-FXa no se une a la placa. Entonces se amplifican los aptámeros de los complejos de TFPI-aptámero no unidos. Se repite este procedimiento durante múltiples ciclos hasta que se identifica un aptámero. Estos experimentos dan como resultado, por ejemplo, la identificación de aptámeros que se unen a una región de la proteína TFPI que media la inhibición de la interacción funcional entre TFPI y FXa.

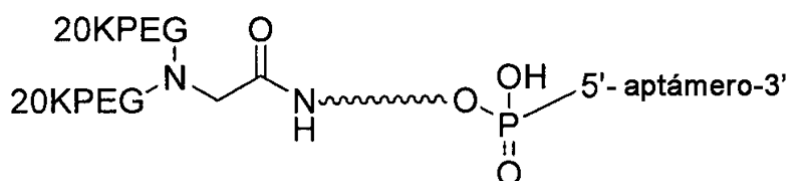
Ejemplo 41

Este ejemplo describe una estrategia para identificar anticuerpos que se unen al menos en parte a o interaccionan de otro modo con una o más partes del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). El antígeno puede ser una cualquiera o más partes de TFPI que son de interés. Por ejemplo, el antígeno puede ser una proteína TFPI que solo contiene los dominios K3 y C-terminal de TFPI de longitud completa (K3-C de TFPI; aminoácidos 182-276). El antígeno se expresa en un sistema de expresión o se sintetiza en un dispositivo de síntesis de proteínas automatizado. Entonces se inmunizan ratones con el antígeno en disolución. Entonces se aíslan células que producen anticuerpos de los ratones inmunizados y se fusionan con células de mieloma para formar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Entonces se cultivan los hibridomas en un medio selectivo. Entonces se siembran en placa las células resultantes mediante dilución en serie y se someten a ensayo para determinar la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno. Entonces se cultivan hibridomas que se secretan anticuerpos monoclonales seleccionados. Entonces se purifican los anticuerpos de sobrenadantes de los medios de cultivo de células de hibridoma. Estos experimentos dan como resultado la identificación de anticuerpos que se unen a TFPI cuyo epítipo de unión está contenido, por ejemplo, dentro de la región K3-C-terminal de la proteína.

Habiéndose descrito ahora la invención a modo de descripción y de ejemplos por escrito, los expertos en la técnica reconocerán que la invención puede ponerse en práctica en una variedad de realizaciones y que la descripción y los ejemplos anteriores son para fines de ilustración y no de limitación de las siguientes reivindicaciones.

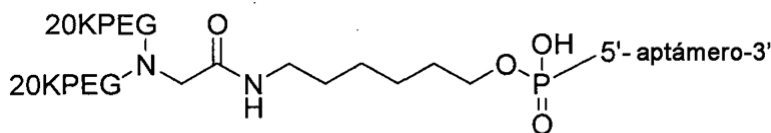
REIVINDICACIONES

1. Aptámero que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), en el que el aptámero compete directamente por unirse a TFPI con un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: AD4903.
2. Aptámero que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), en el que el aptámero comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.
3. Aptámero según la reivindicación 2, en el que el TFPI es TFPI humano.
4. Aptámero según la reivindicación 2 o 3, en el que el aptámero tiene una constante de disociación para TFPI humano de 100 nM o menos.
5. Aptámero según la reivindicación 2, 3 o 4, en el que el aptámero comprende al menos una modificación química.
6. Aptámero según la reivindicación 5, en el que la modificación se selecciona del grupo que consiste en: una sustitución química en una posición de azúcar, una sustitución química en una unión entre nucleótidos, y una sustitución química en una posición de base.
7. Aptámero según la reivindicación 5, en el que la modificación se selecciona del grupo que consiste en: incorporación de un nucleótido modificado; una caperuza en 3'; una caperuza en 5'; conjugación con un compuesto no inmunogénico de alto peso molecular; conjugación con un compuesto lipófilo; incorporación de un motivo CpG; e incorporación de un fosforotioato o fosforditioato en la estructura principal de fosfato.
8. Aptámero o sal del mismo que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), en el que el aptámero comprende la estructura siguiente:

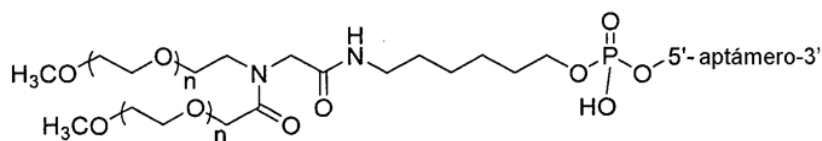


en la que HN ~~~~~ PO₃H procede de una fosoramidita con ligador de 5'-amina, y

- en el que el aptámero comprende la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mGmG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 2), en la que "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo, y en la que 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.
9. Aptámero según la reivindicación 8, en el que el ligador se selecciona del grupo que consiste en: 2-18 grupos CH₂ consecutivos, 2-12 grupos CH₂ consecutivos, 4-8 grupos CH₂ consecutivos y 6 grupos CH₂ consecutivos.
10. Aptámero o sal del mismo que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), en el que el aptámero comprende la estructura siguiente:



- en el que el aptámero comprende la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mGmG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 2), en la que "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo, y en la que 20KPEG es un resto mPEG que tiene un peso molecular de 20 kDa.
11. Aptámero o sal del mismo que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), en el que el aptámero comprende la estructura siguiente:



en el que el aptámero comprende la secuencia de ácido nucleico de mG-mG-mA-mA-mU-mA-mU-mA-dC-mU-mU-mGmG-dC-mU-dC-mG-mU-mU-mA-mG-mG-mU-mG-dC-mG-mU-mA-mU-mA-mU-mA-3T (SEQ ID NO: 2), en la que "n" es aproximadamente 450, "3T" es una desoxitimidina invertida, "dN" es un desoxinucleótido y "mN" es un nucleótido que contiene 2'-O-metilo.

12. Aptámero que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano, en el que el aptámero compite por unirse a TFPI con un aptámero de referencia seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

13. Aptámero que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) humano y comprende un motivo de tallo y bucle que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, en el que:

a) uno cualquiera o más de los nucleótidos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 13, 17, 20, 21, 22, 24, 28, 30 y 32 puede estar modificado de una sustitución 2'-OMe a una sustitución 2'-desoxi;

b) uno cualquiera o más de los nucleótidos 5, 7, 15, 19, 23, 27, 29 y 31 puede estar modificado de un 2'-OMe-uracilo a o bien un 2'-desoxi-uracilo o bien una 2'-desoxi-timina;

c) el nucleótido 18 puede estar modificado de un 2'-OMe-uracilo a un 2'-desoxi-uracilo; y/o

d) uno cualquiera o más de los nucleótidos 14, 16 y 25 puede estar modificado de una 2'-desoxi-citosina a o bien una 2'-OMe-citosina o bien una 2'-fluoro-citosina.

14. Aptámero que se une al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), en el que el aptámero comprende una secuencia primaria de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

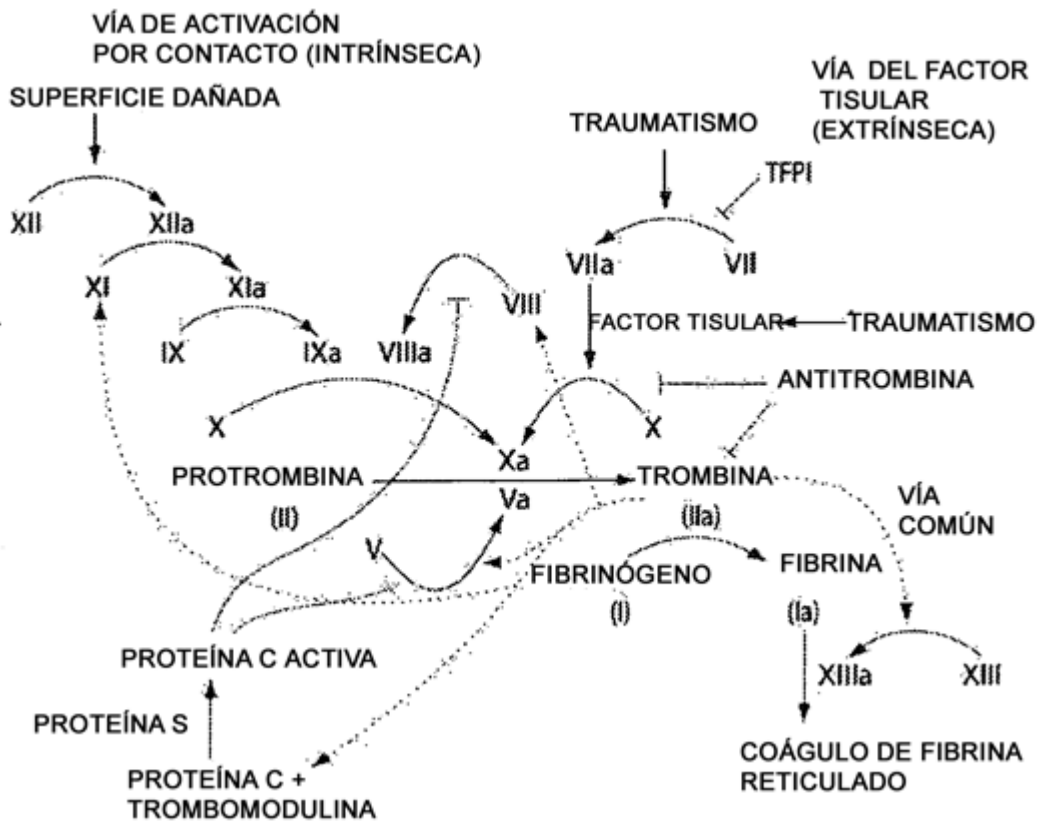


Fig. 1

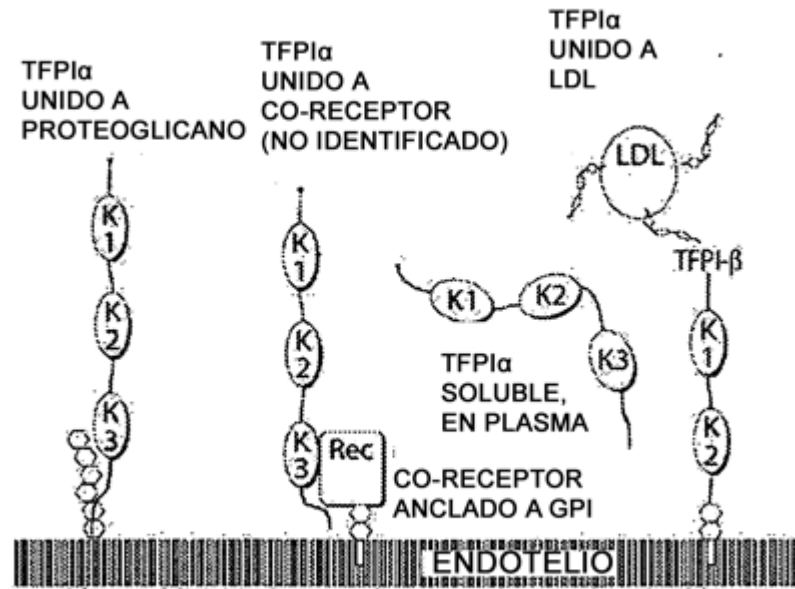


Fig. 2

Fig. 3A

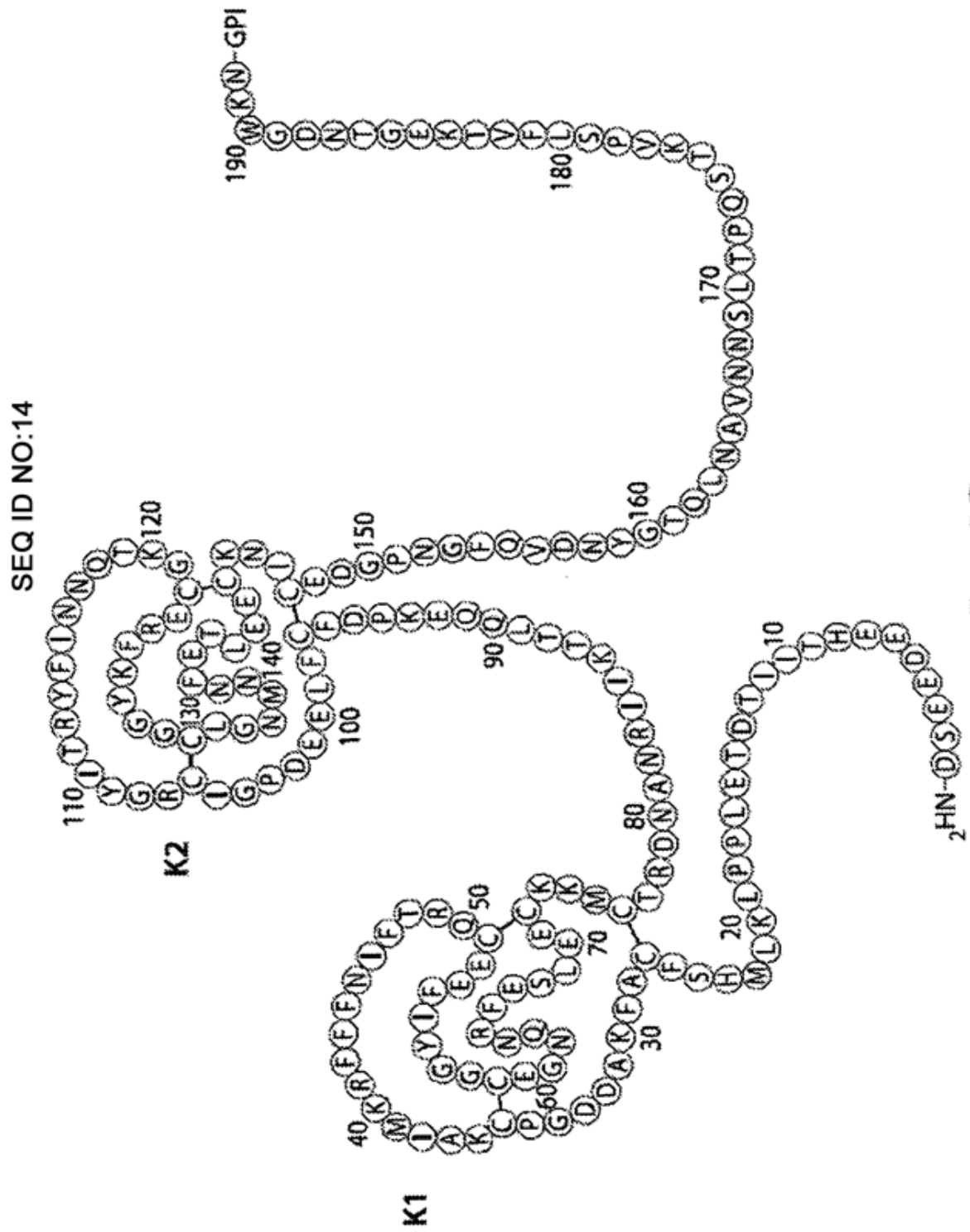


Fig. 3B

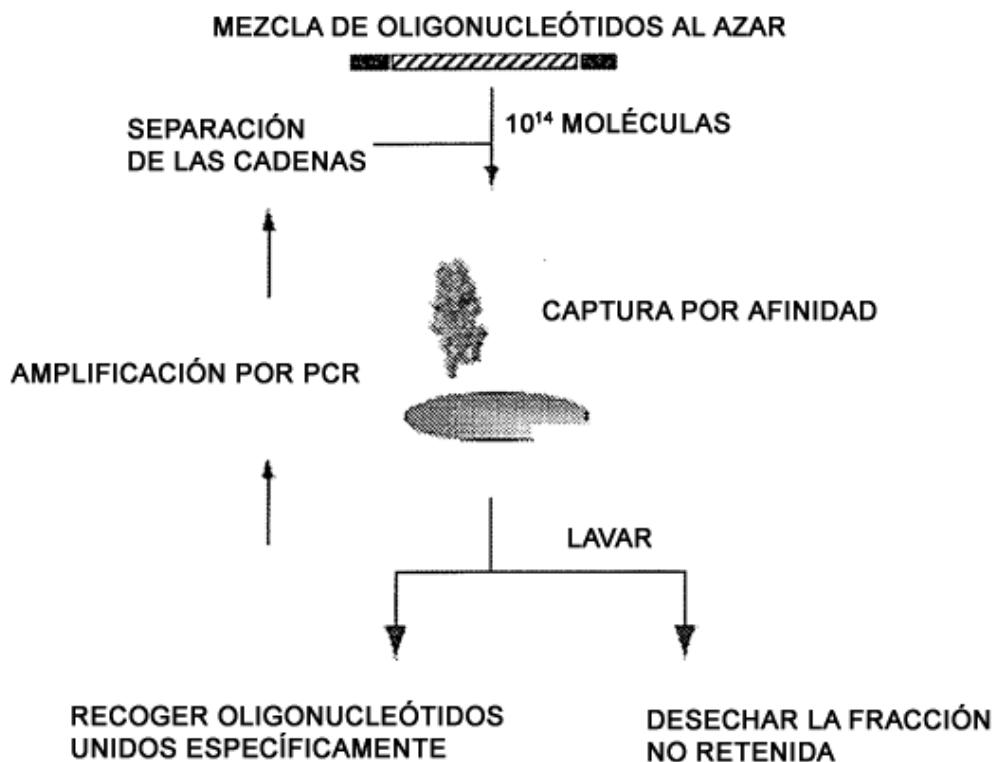


Fig. 4

DSEEDDEHTIITDTLPPLXLMHSFCAFKADDGPCKAIMKRFFNFIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFSLEECKK
MCTRDNANRIIKTTLQOEKPDFCFLEEDPGICRGYITRYFYNNQTRQCERFKYGGCLGNMNNFETLEECKNICE
DGPNGFQVDNYGTQLNAVNNSLTPQSTKVPSLFEFHGPSWCLTPADRGLCRANENRFYNSVIGKCRPFKYSGC
GGNENNFSTSKQECLRACKKGFIQRISKGGLIKTKRKRKKQRVKIAEZEIFVKNM (SEQ ID NO:11)

Fig. 5

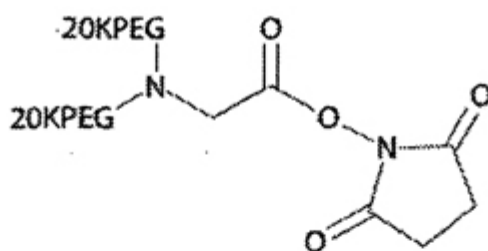


Fig. 6

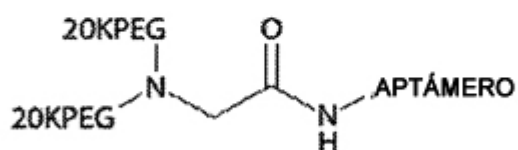


Fig. 7

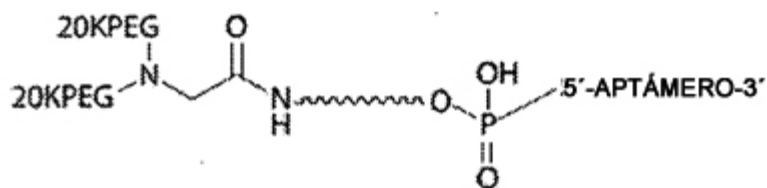


Fig. 8

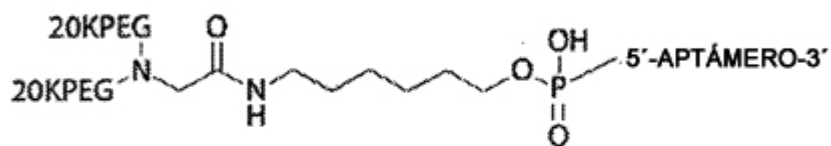


Fig. 9A

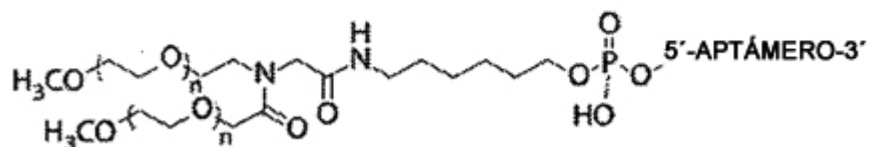
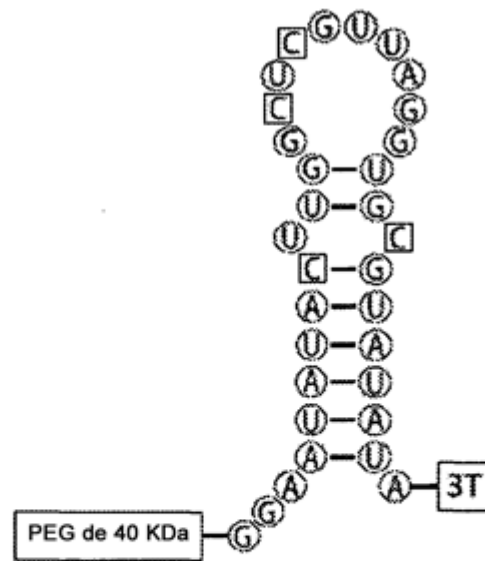
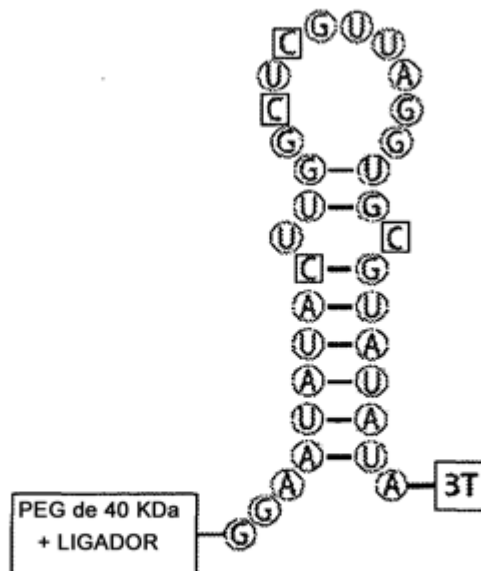


Fig. 9B



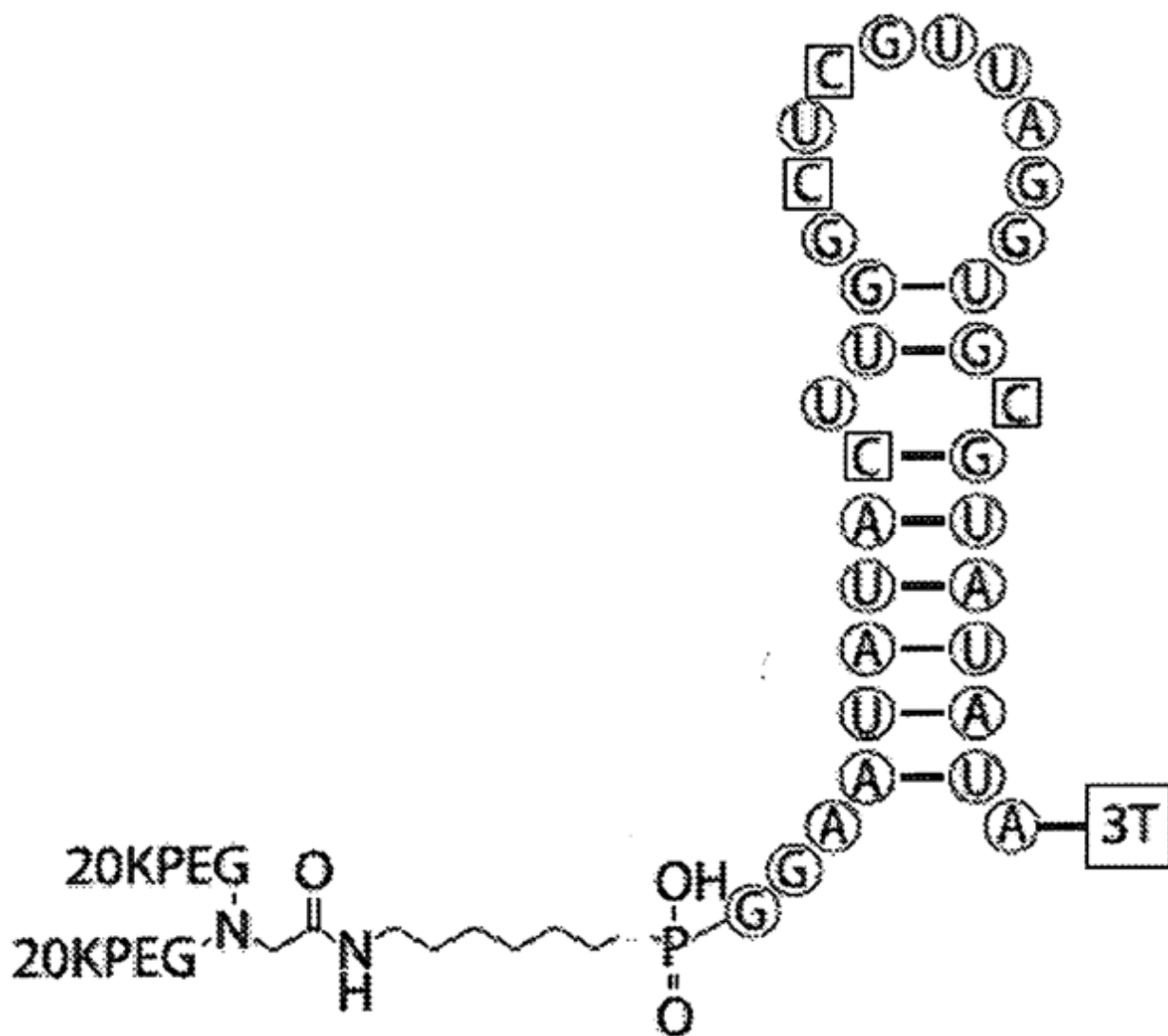
SEQ ID NO:2 CON UN RESTO PEG DE 40 kDa

Fig. 10A



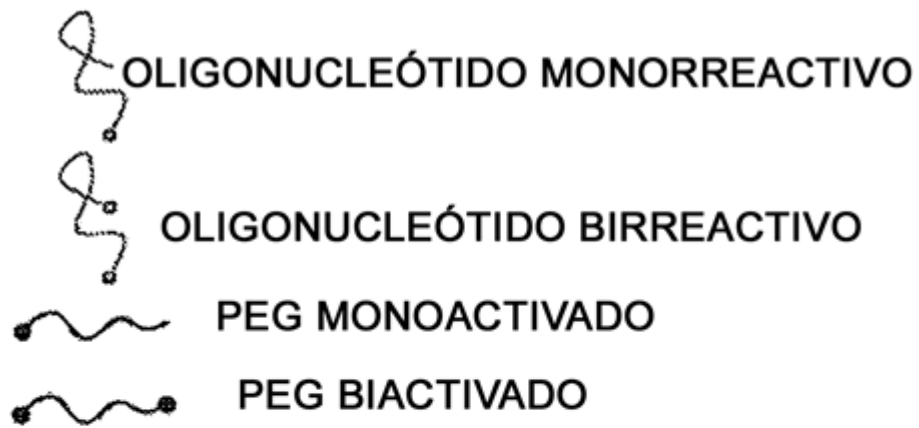
SEQ ID NO: 2 CON UN LIGADOR Y
UN RESTO PEG DE 40 kDa

Fig. 10B

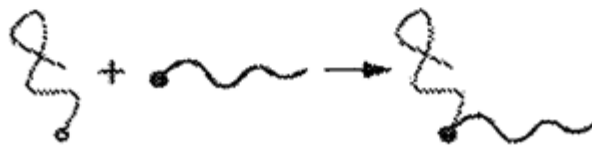


SEQ ID NO: 4

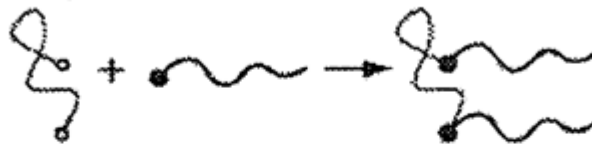
Fig. 10C



PEGILACIÓN CONVENCIONAL



PEGILACIÓN MÚLTIPLE



DIMERIZACIÓN A TRAVÉS DE PEGILACIÓN

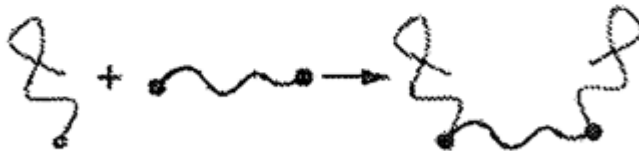


Fig. 11

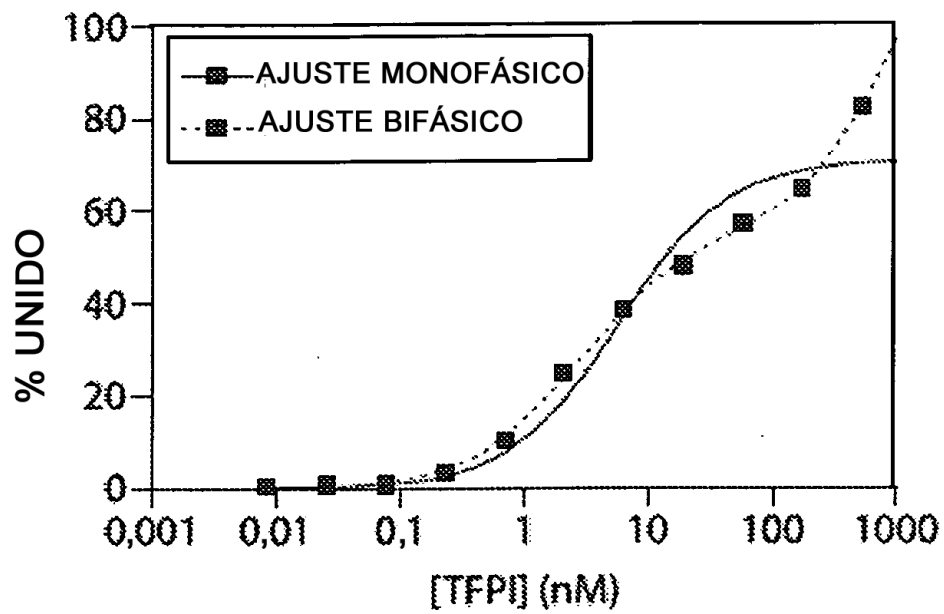


Fig. 12A

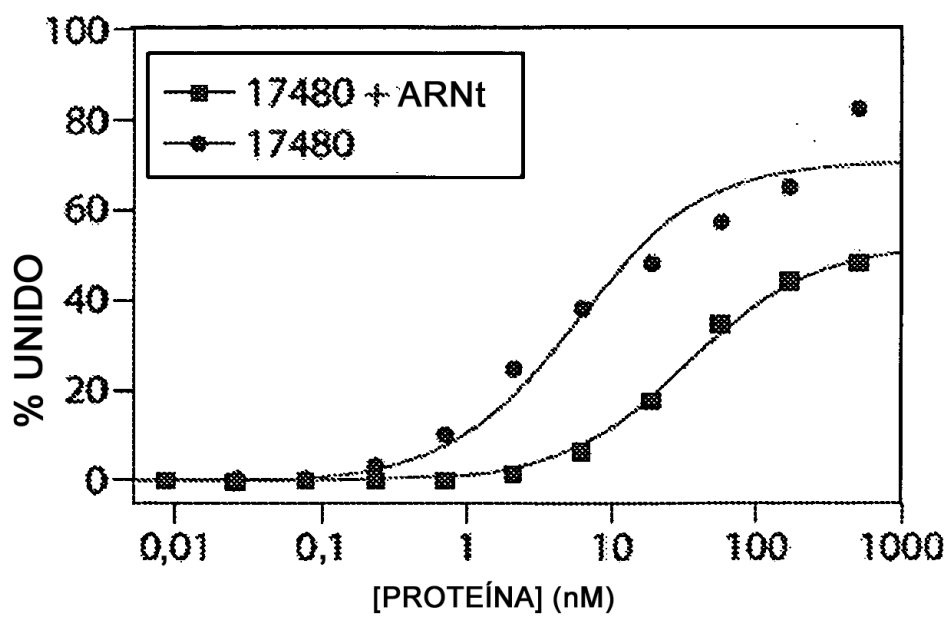


Fig. 12B

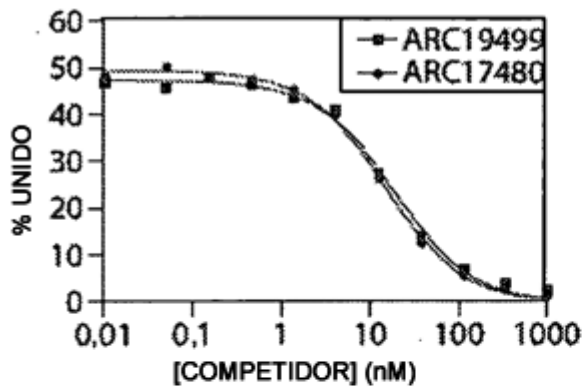


Fig. 13A

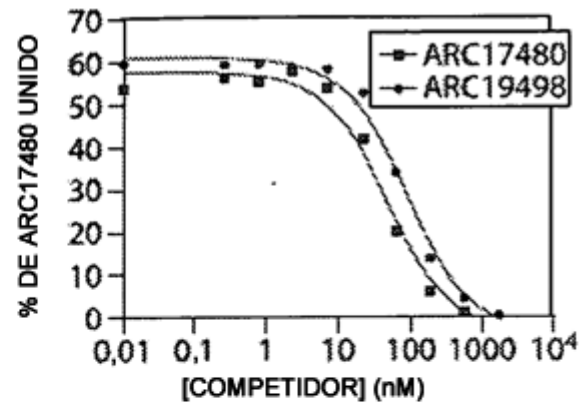


Fig. 13B

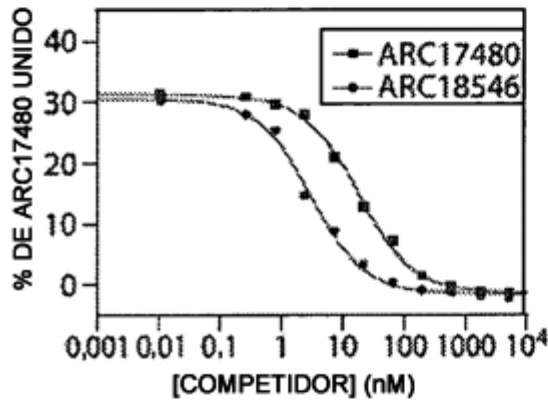


Fig. 13C

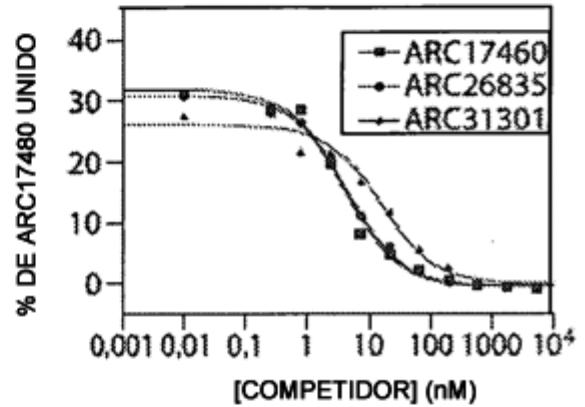


Fig. 13D

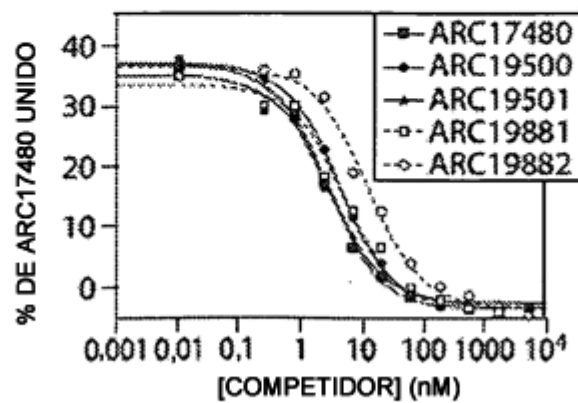
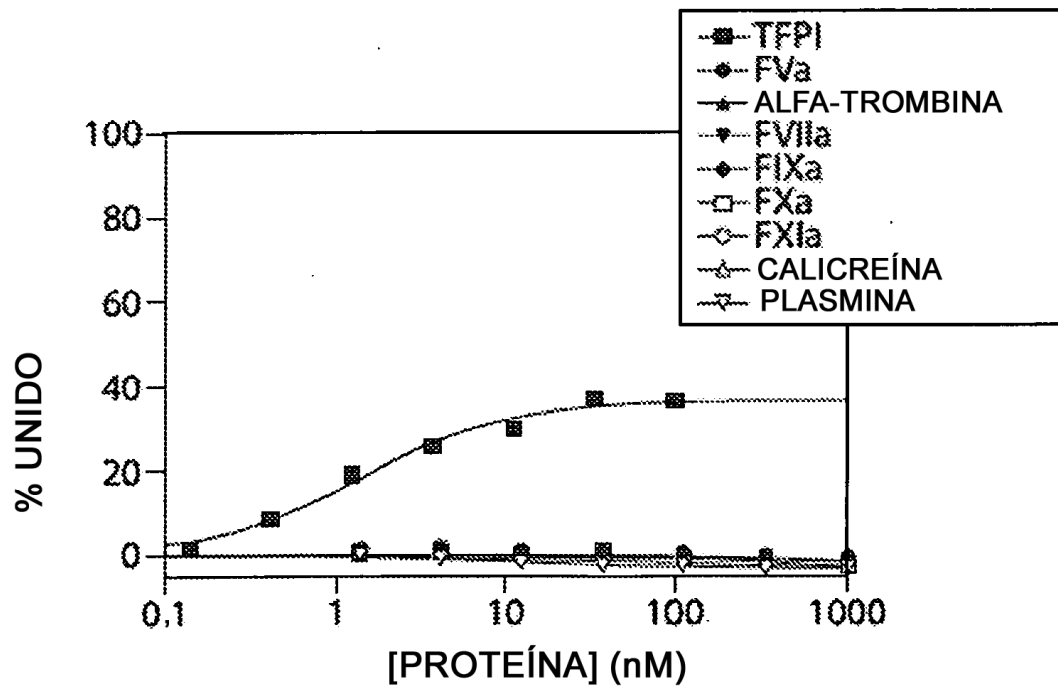
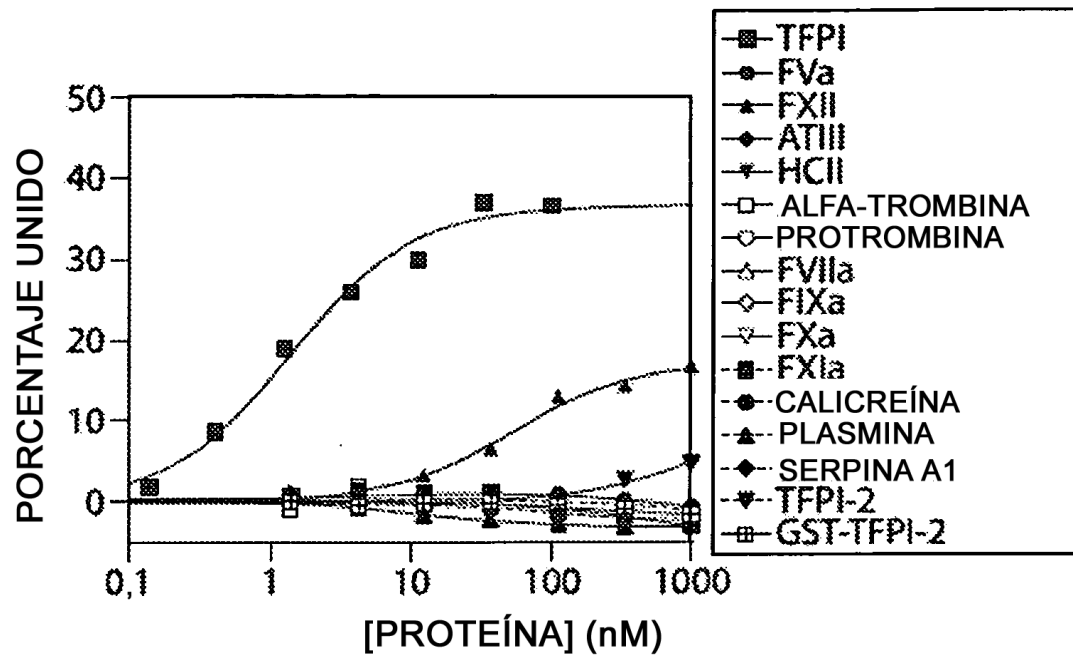


Fig. 13E



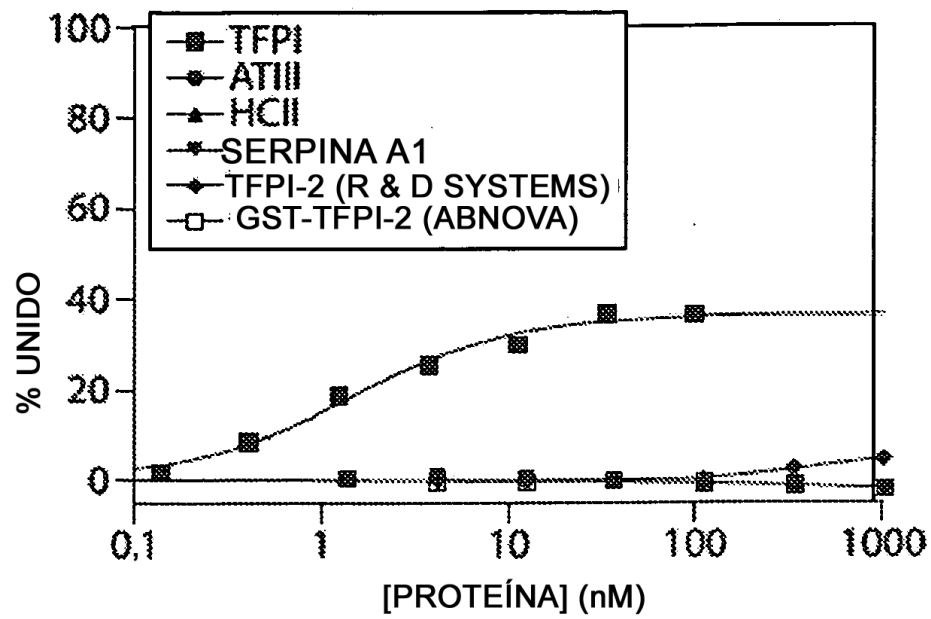


Fig. 14C

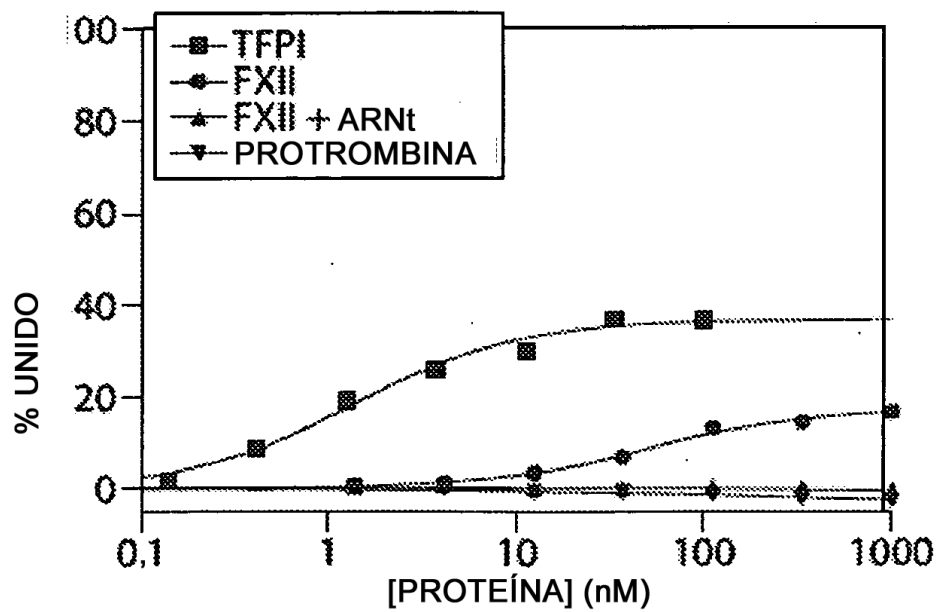


Fig. 14D

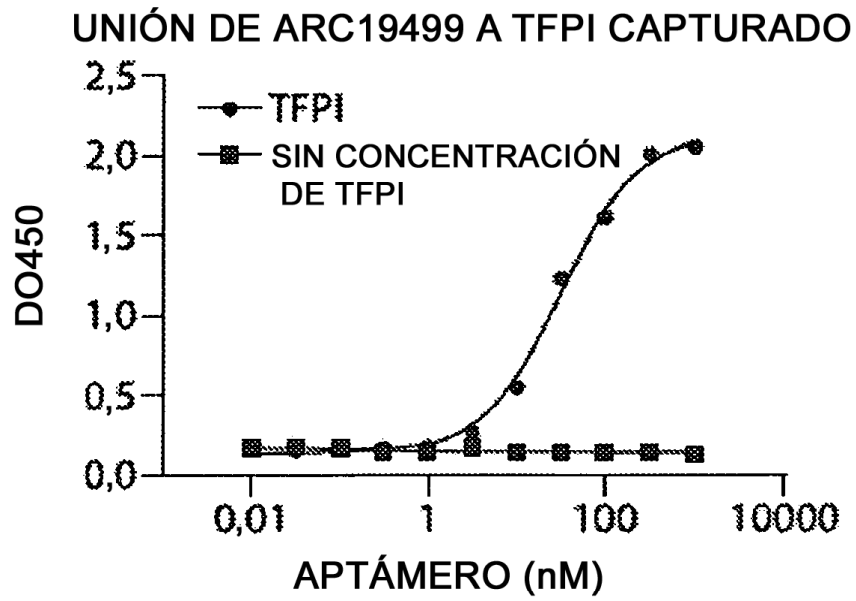


Fig. 15

COMPETENCIA DE UNIÓN DE ARC19499

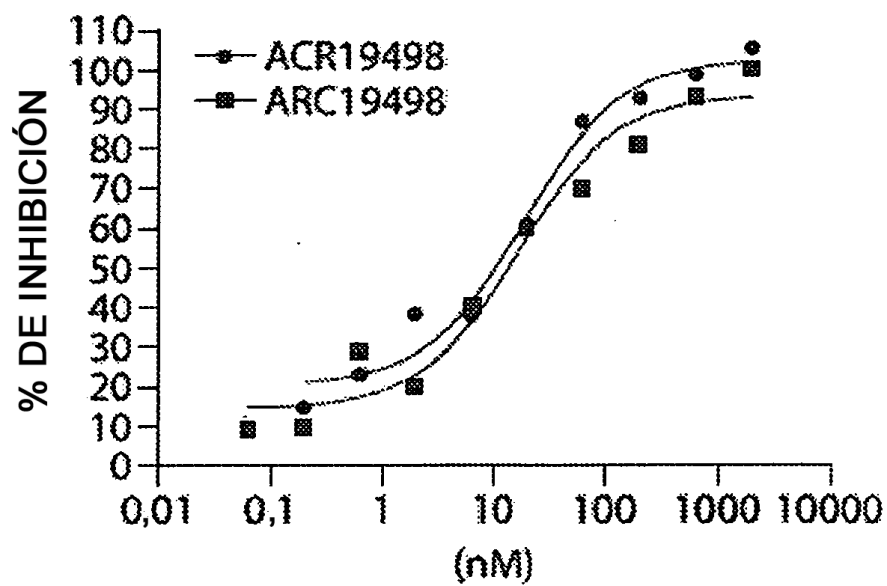


Fig. 16

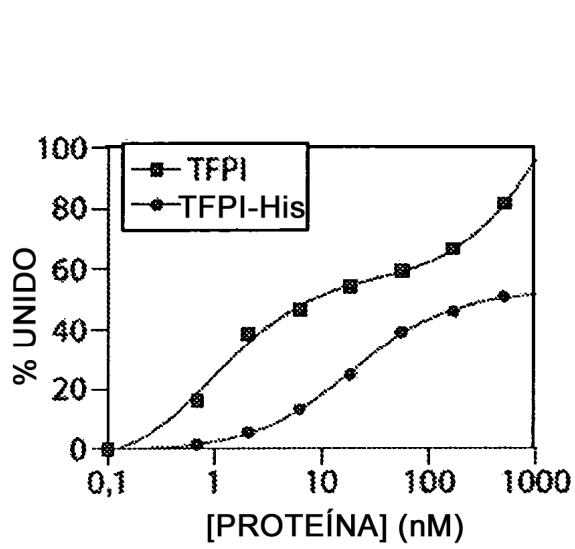


Fig. 17A

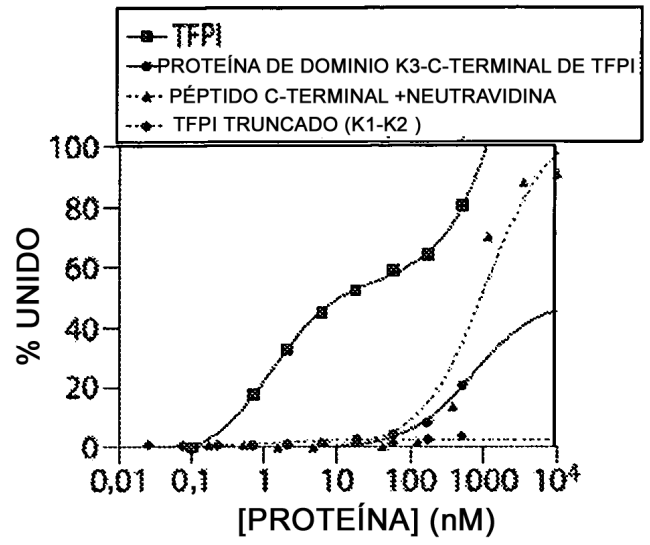


Fig. 17B

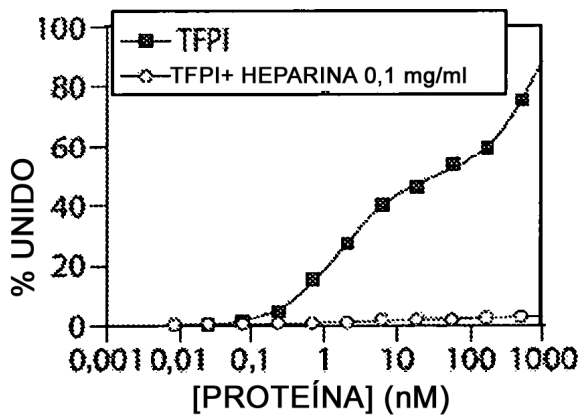


Fig. 18A

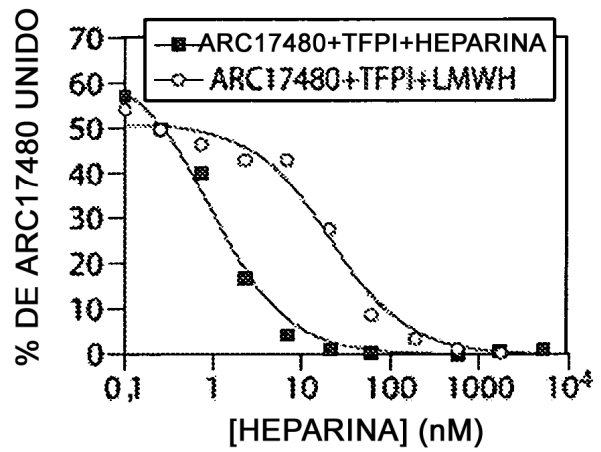


Fig. 18B

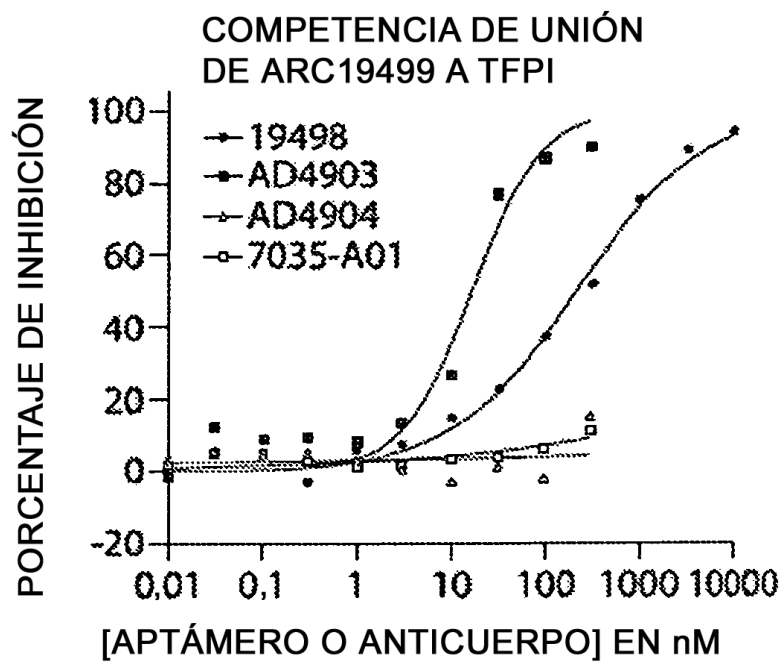


Fig. 19A

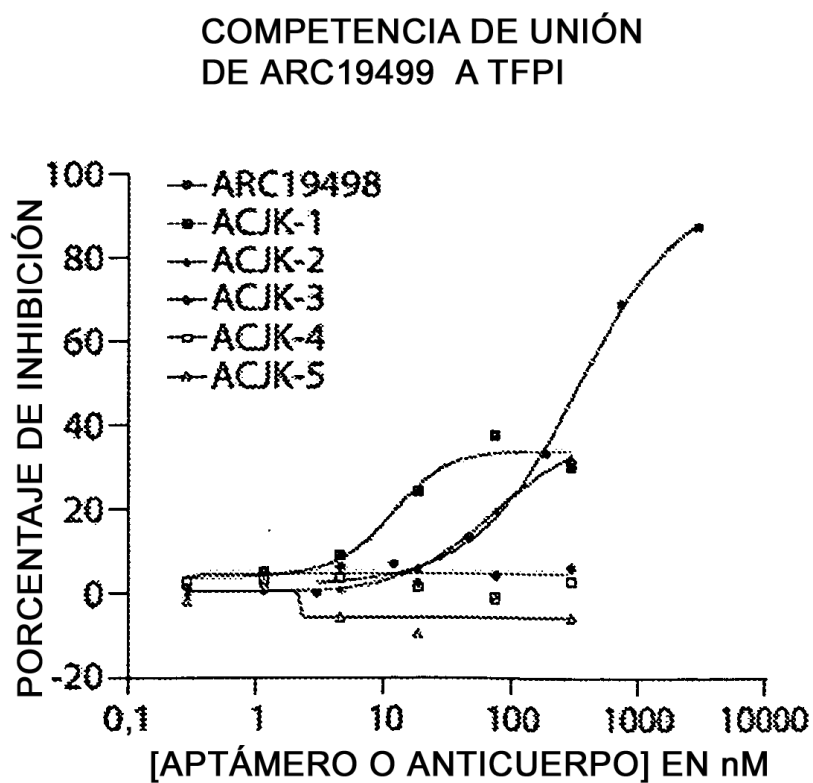


Fig. 19B

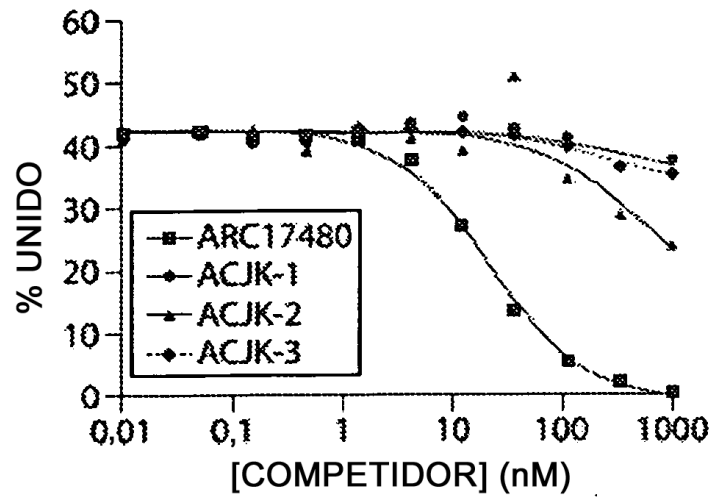


Fig. 20A

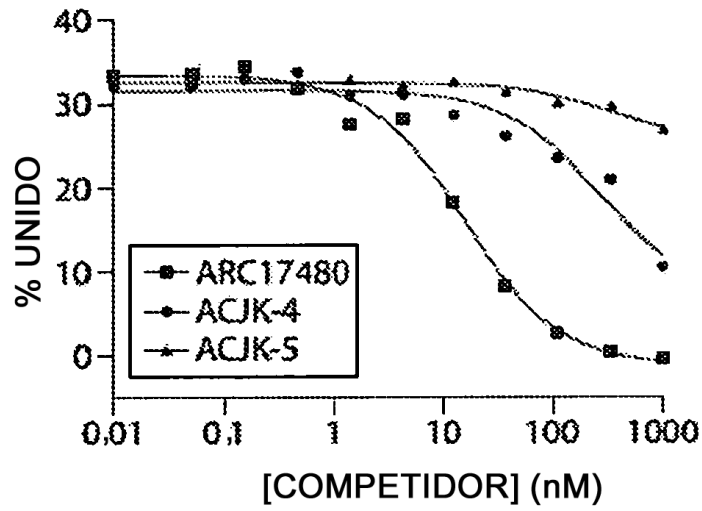


Fig. 20B

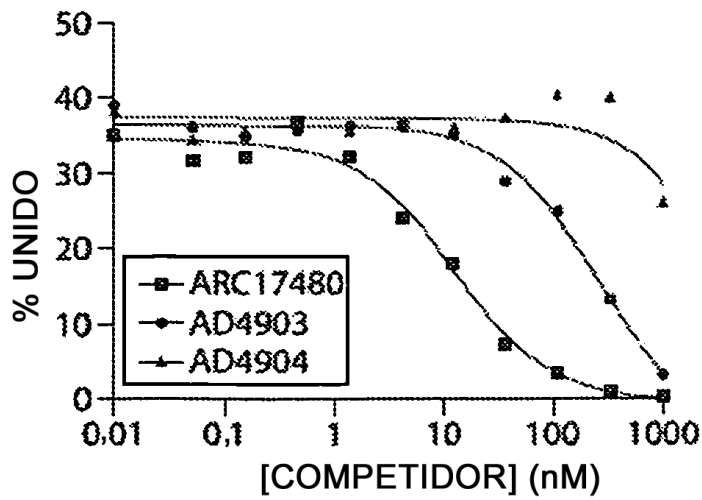


Fig. 20C

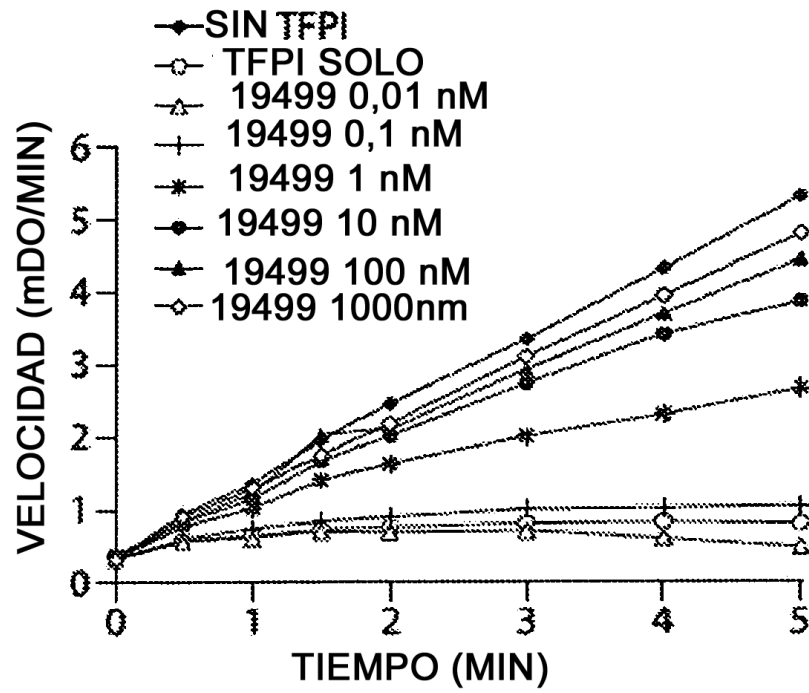


Fig. 21A

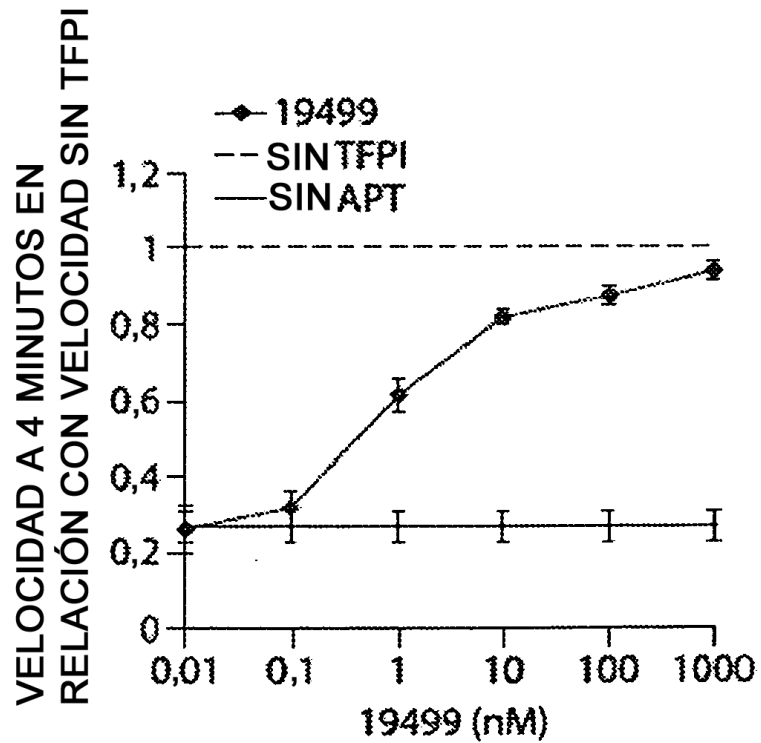


Fig. 21B

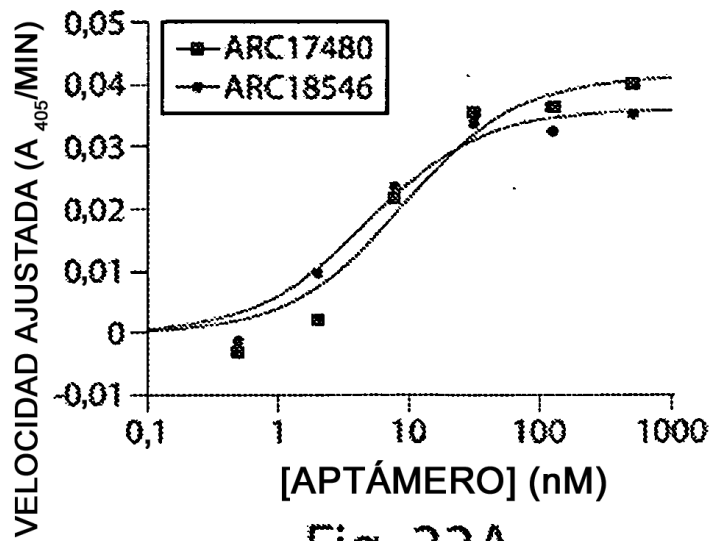


Fig. 22A

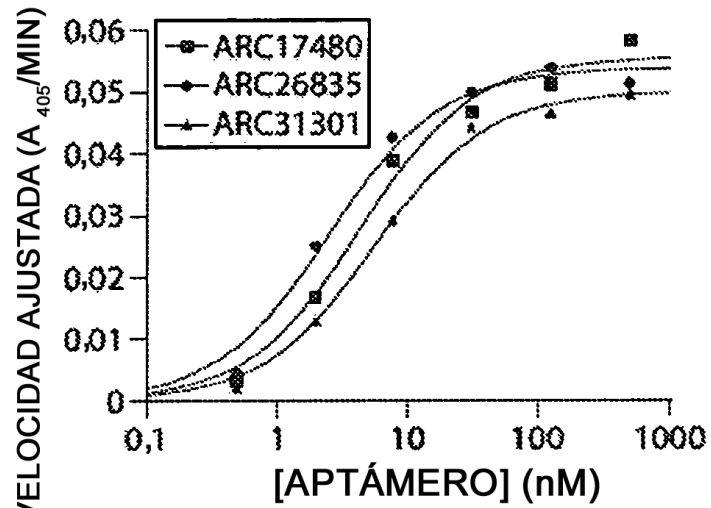


Fig. 22B

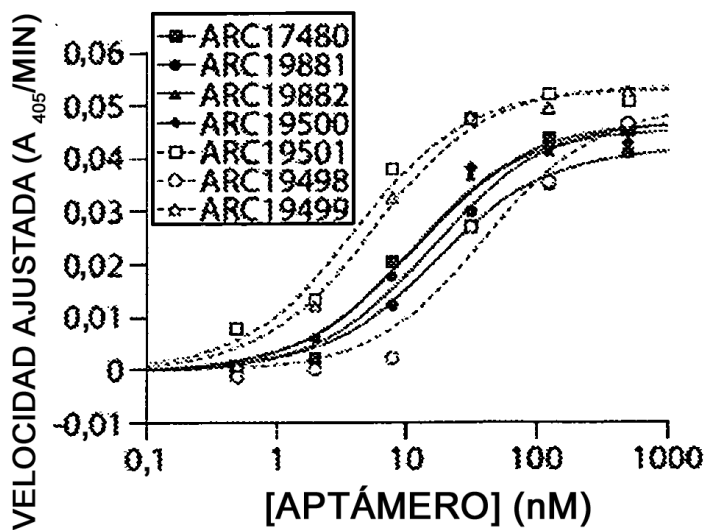


Fig. 22C

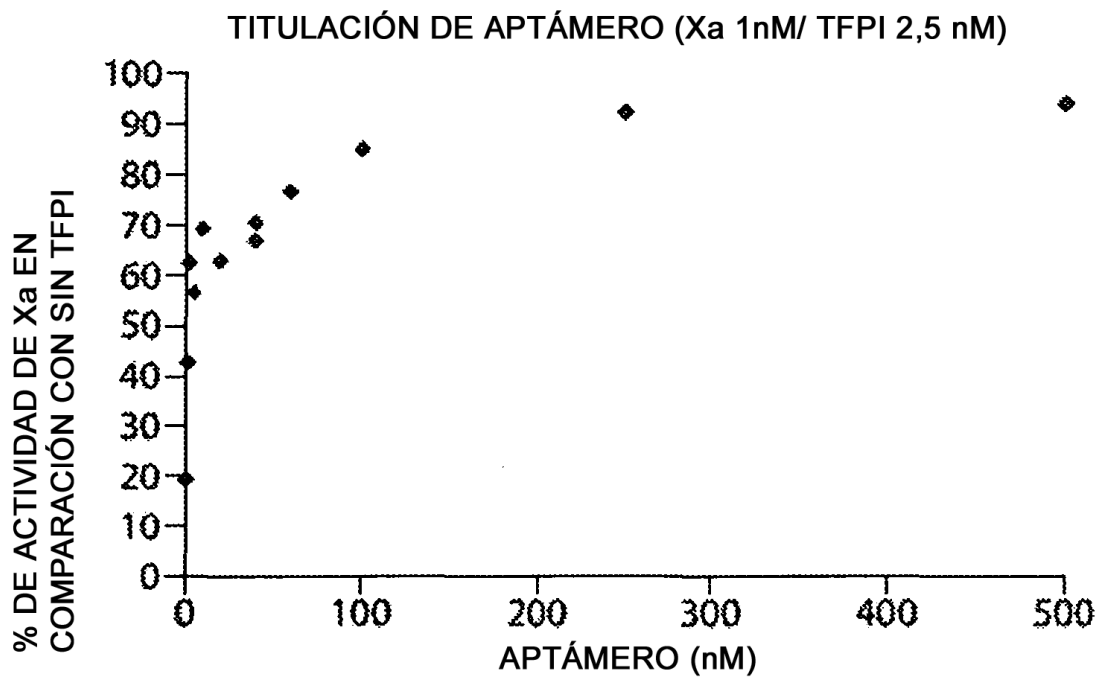


Fig. 23

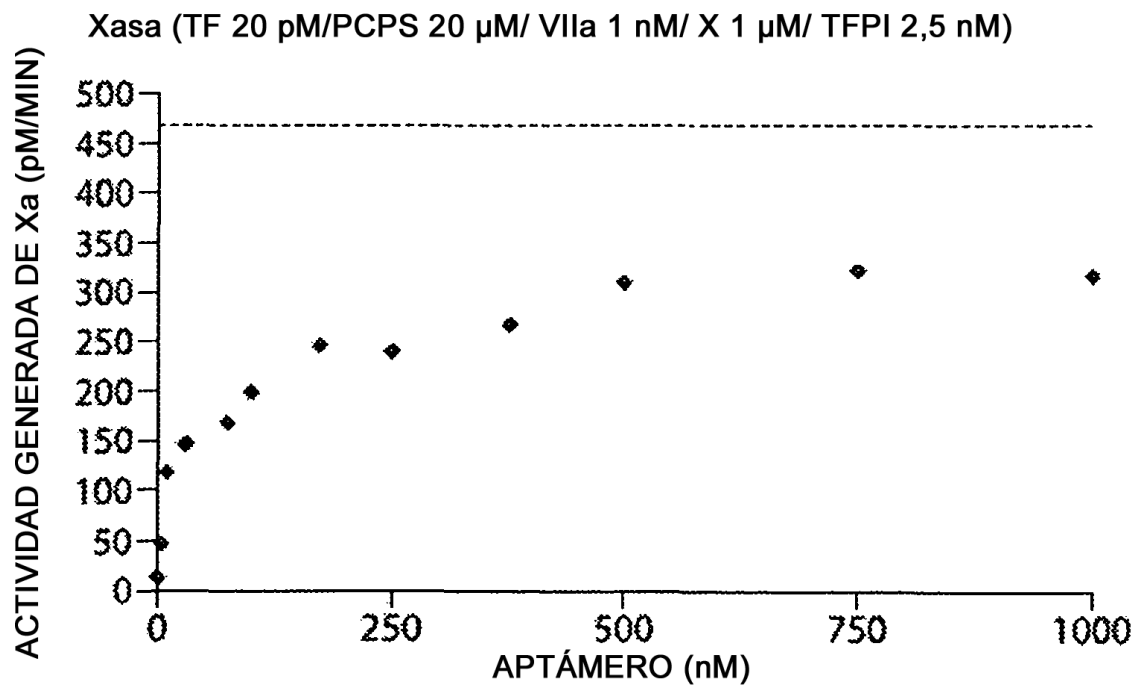


Fig. 24

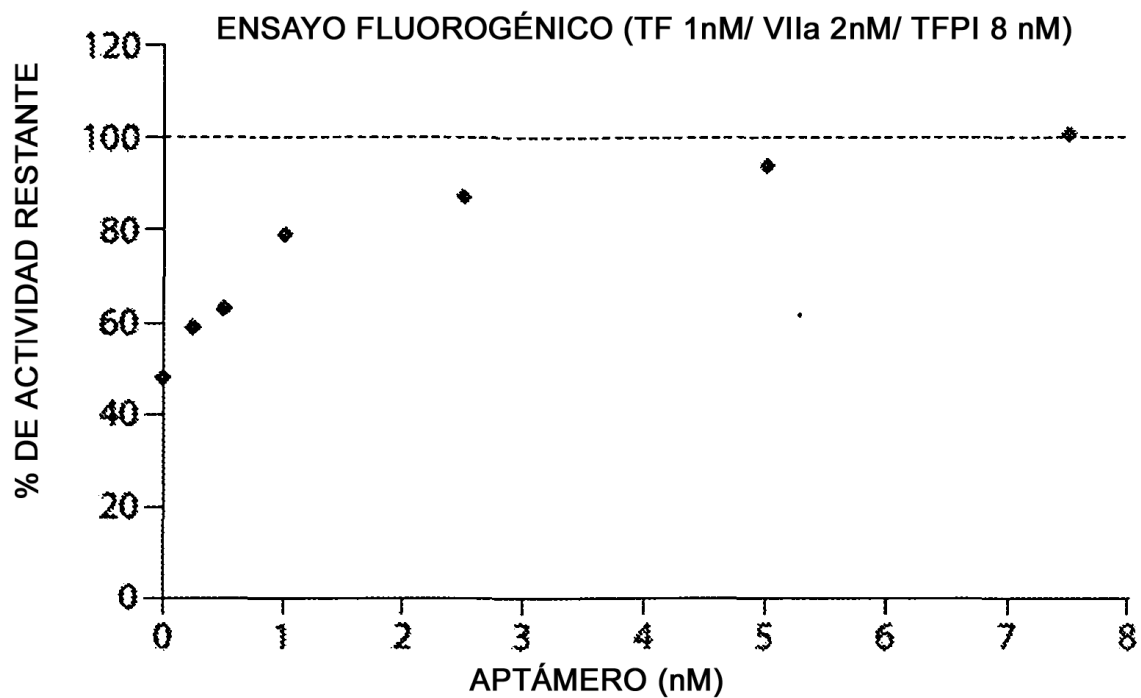


Fig. 25

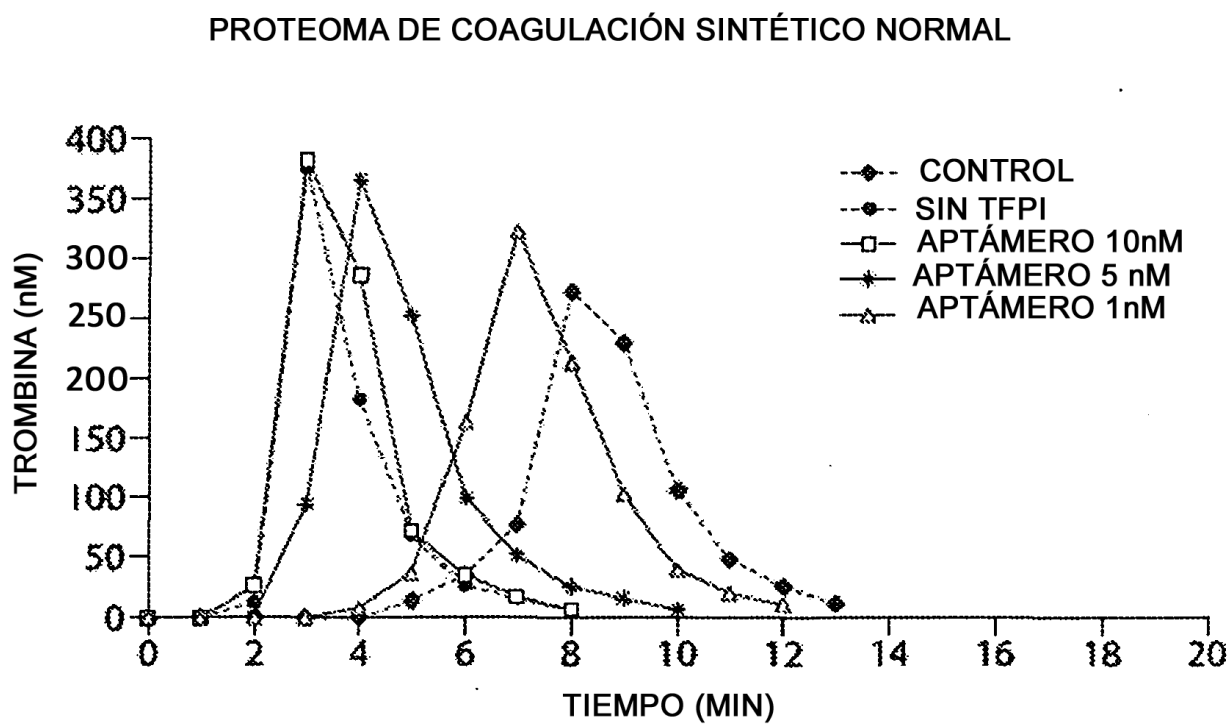
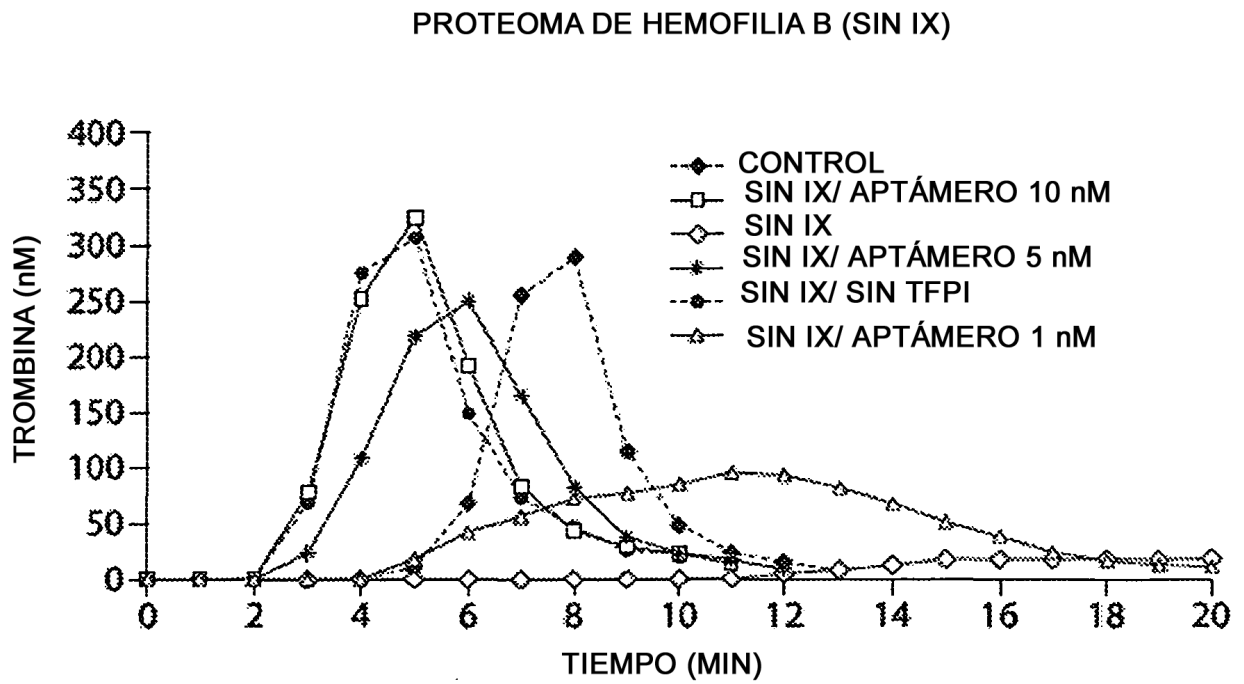
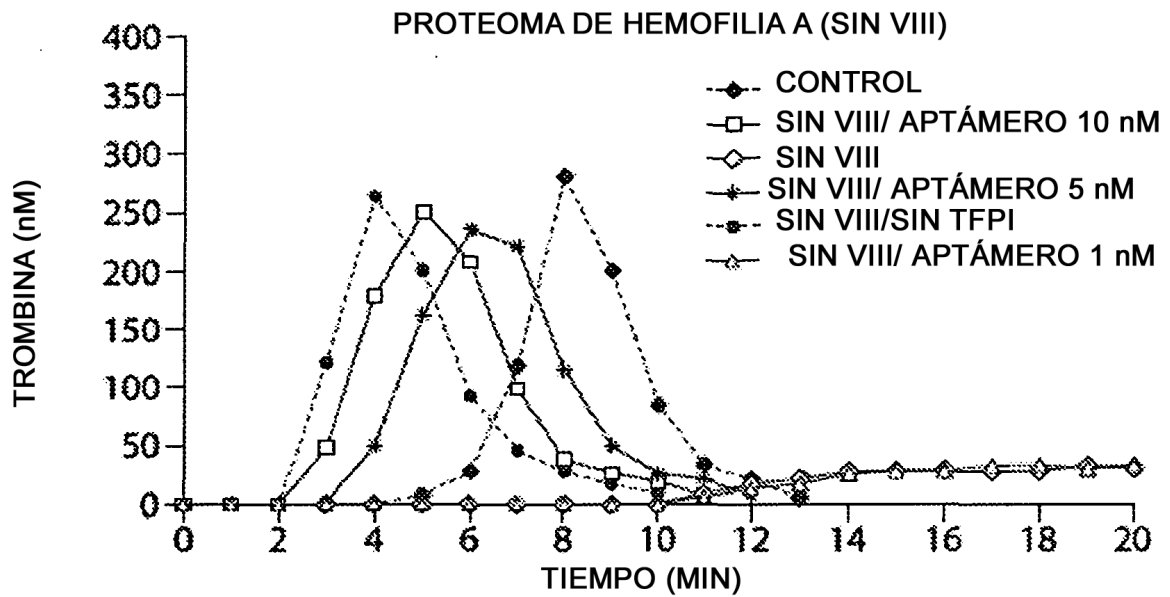


Fig. 26



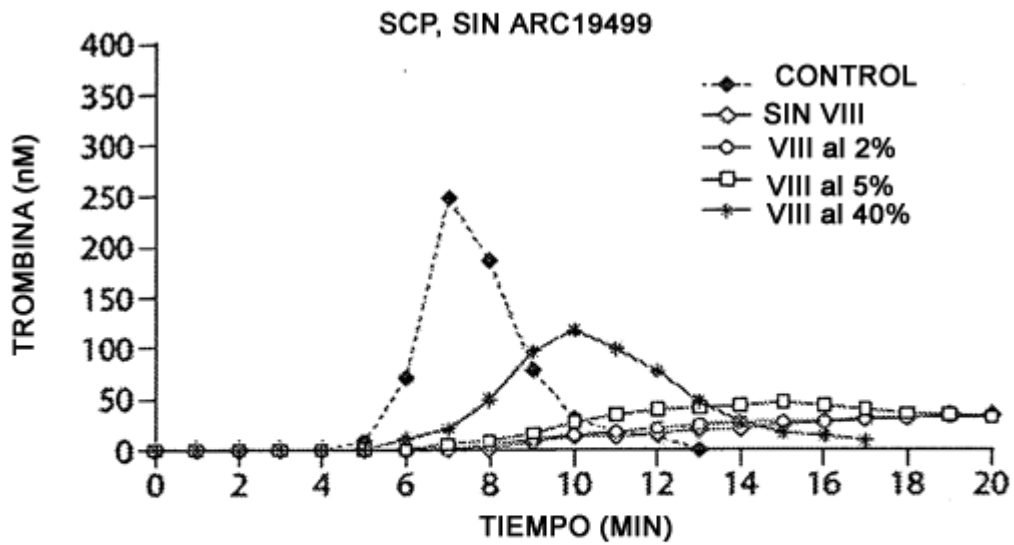


Fig. 29

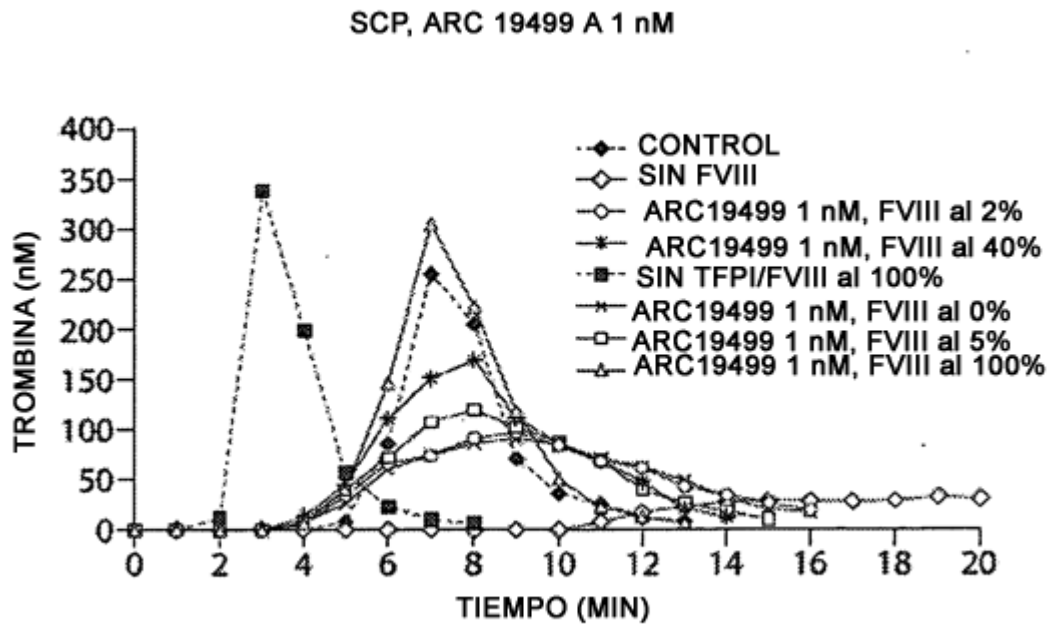


Fig. 30

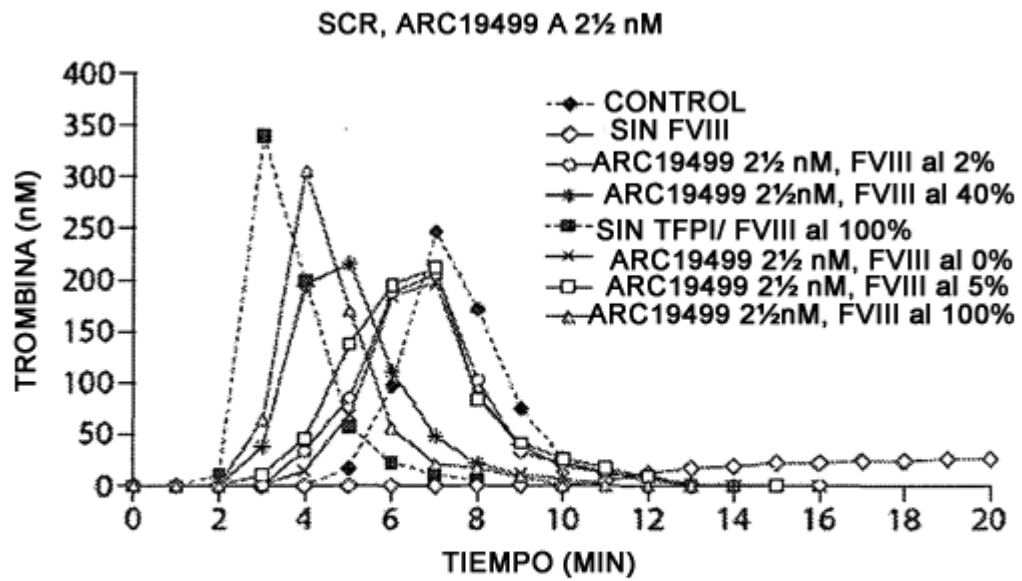


Fig. 31

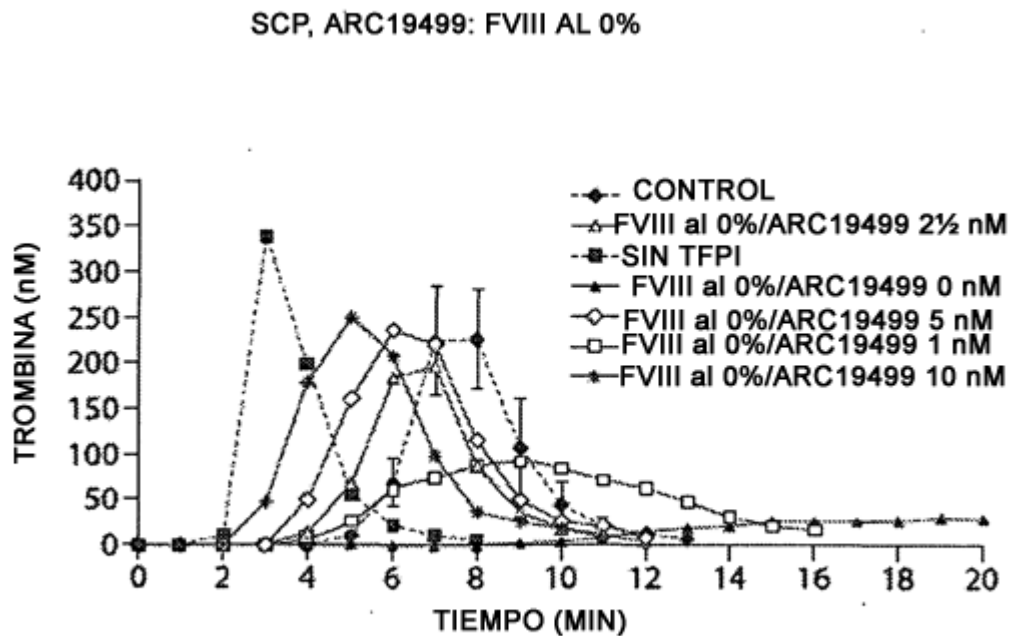
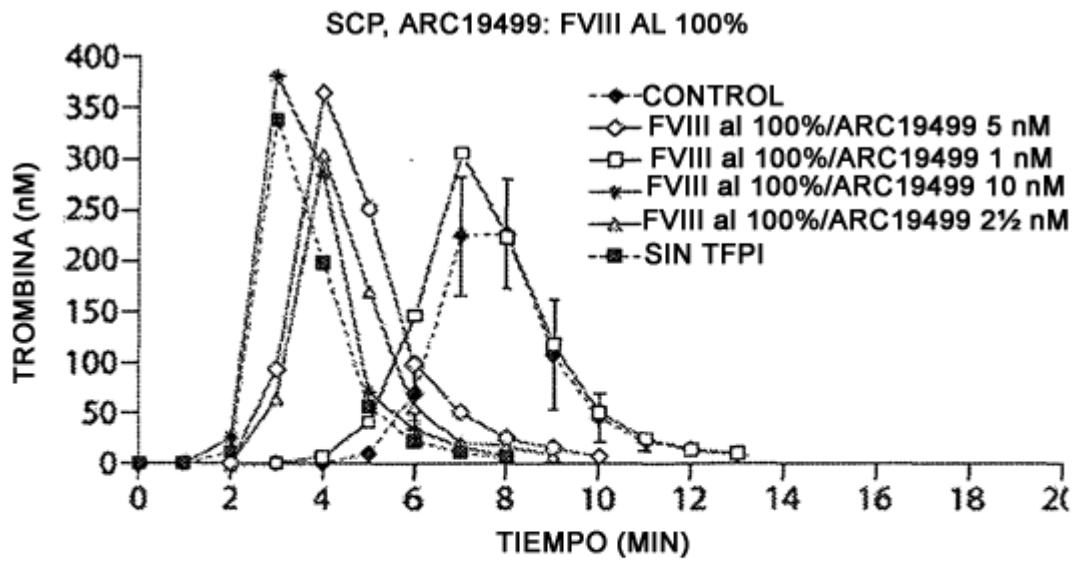
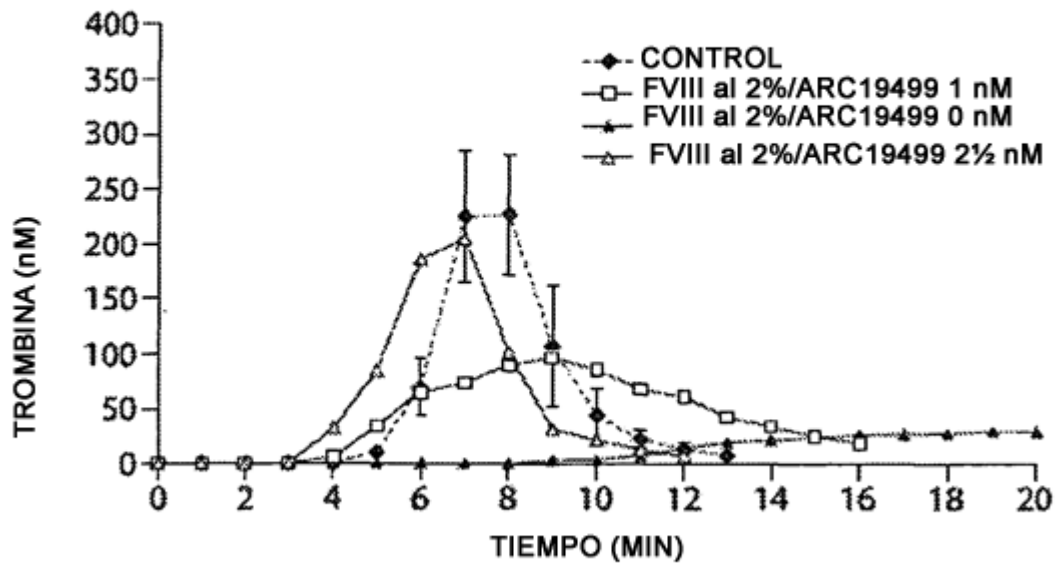


Fig. 32



SCP, ARC19499: FVIII AL 2%



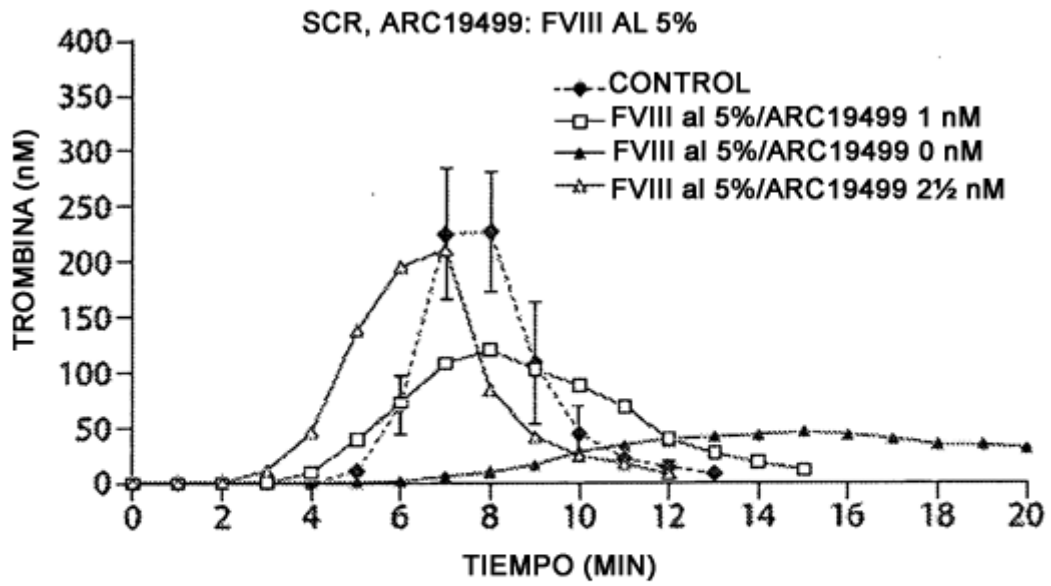


Fig. 35

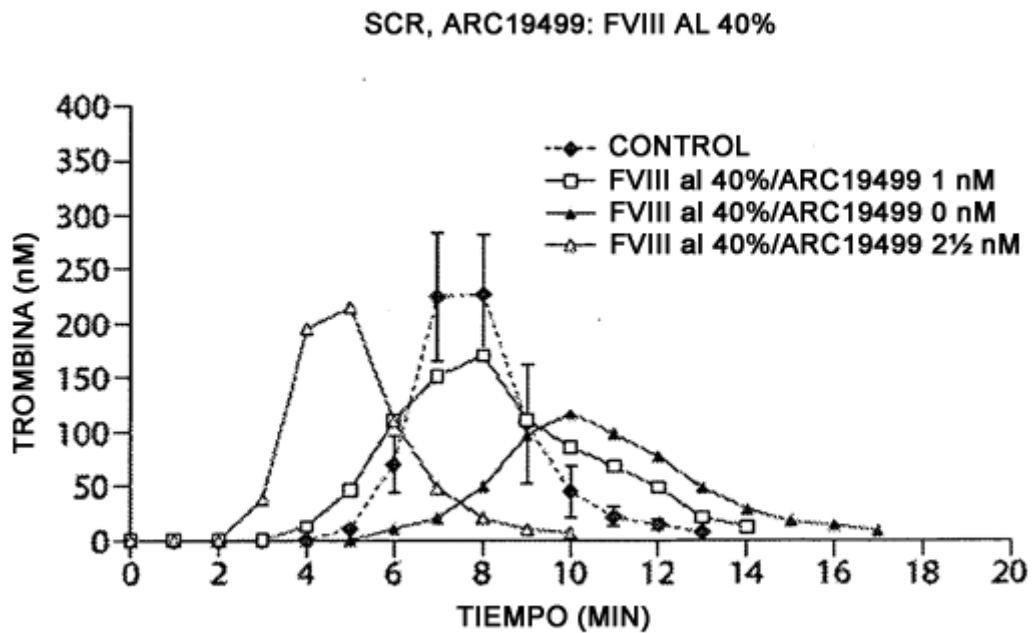


Fig. 36

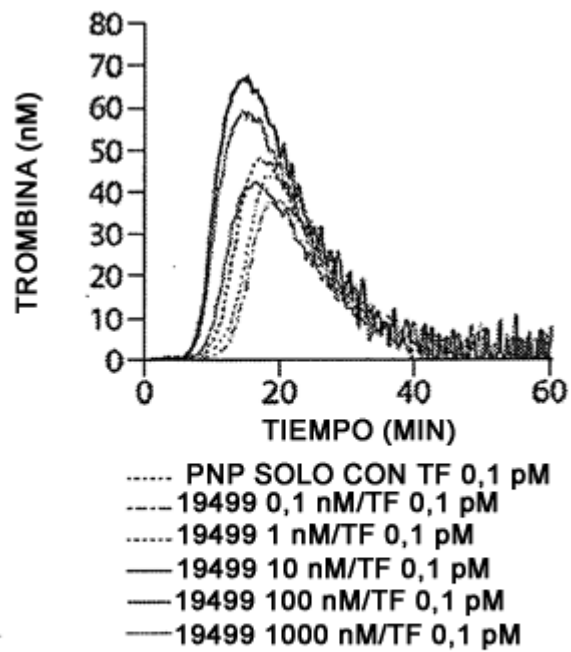


Fig. 37A

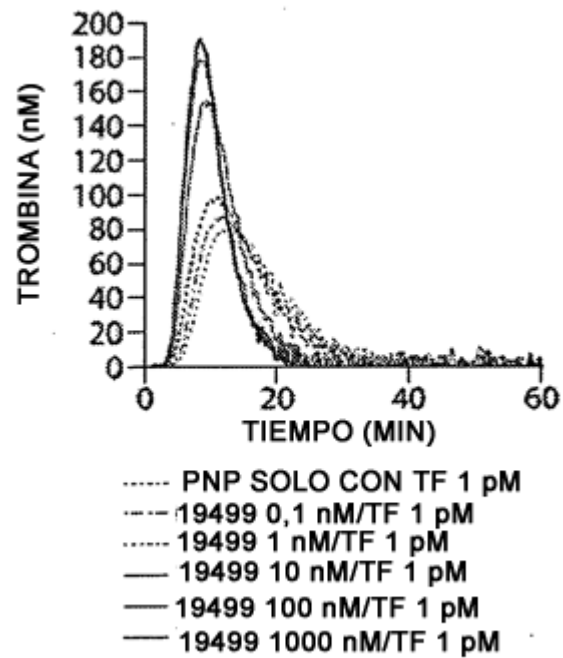


Fig. 37B

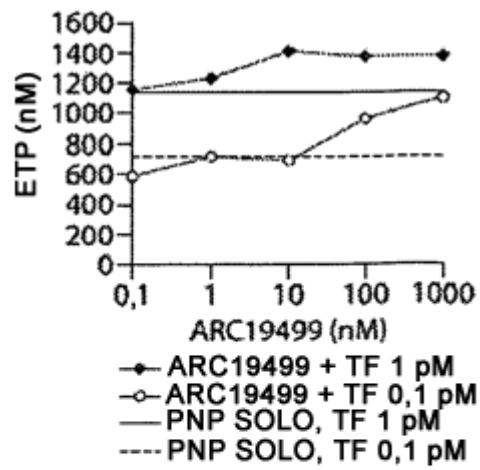


Fig. 37C

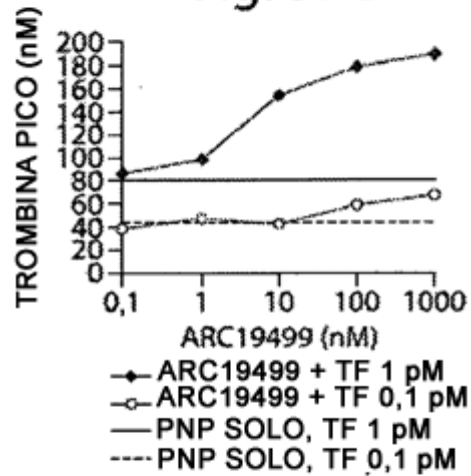


Fig. 37D

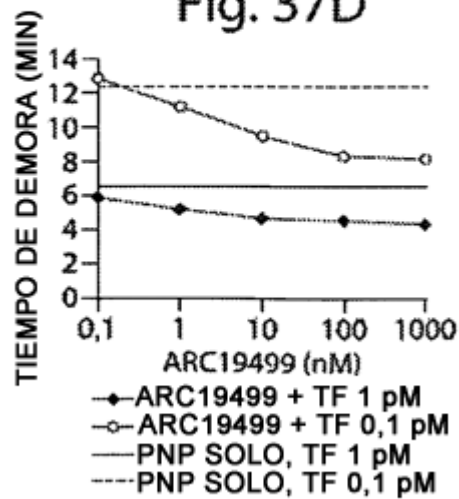
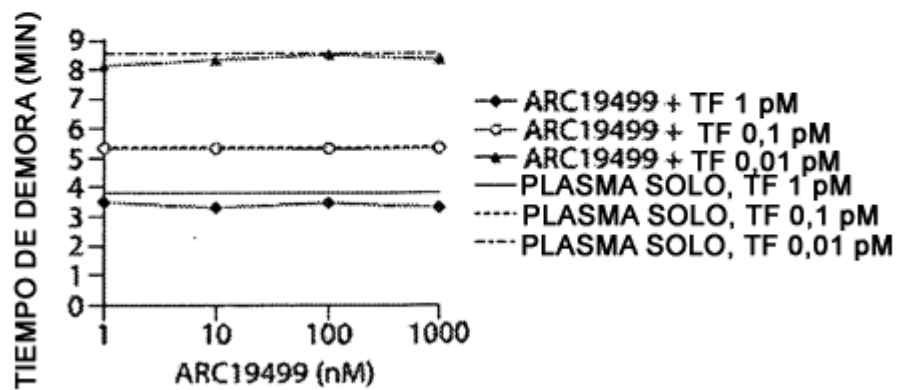
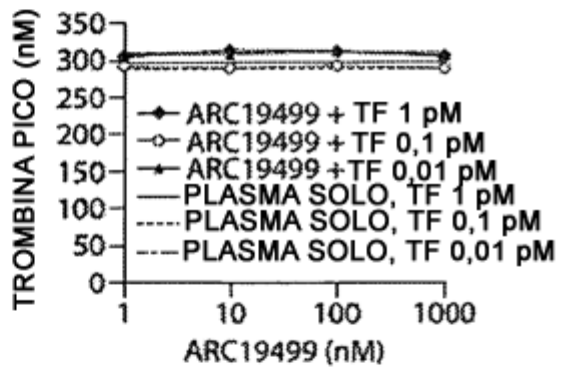
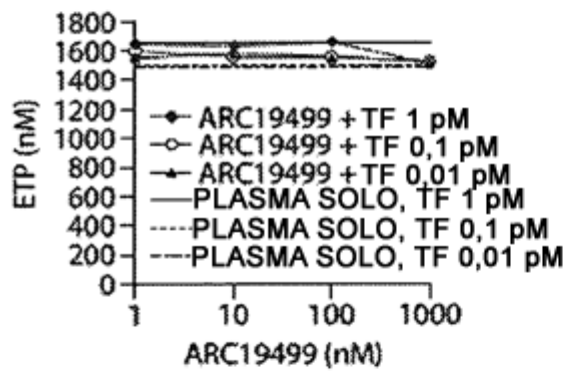
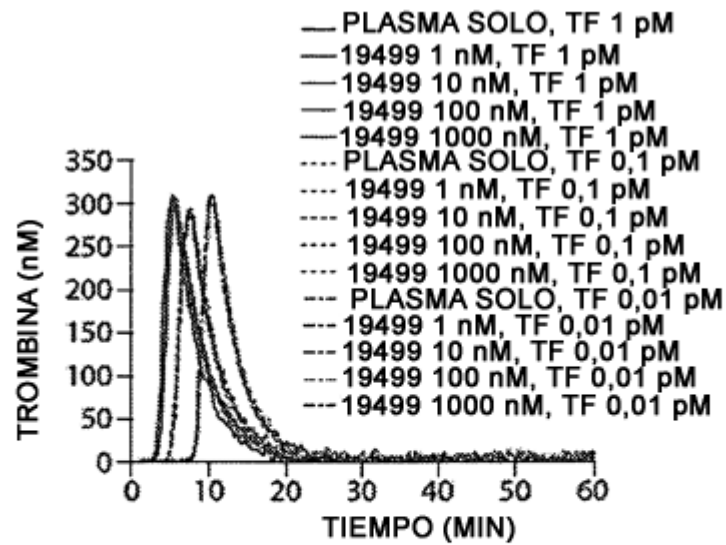


Fig. 37E



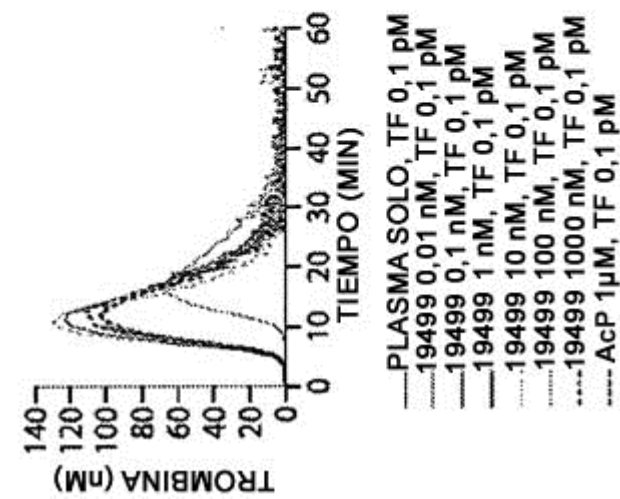


Fig. 39A

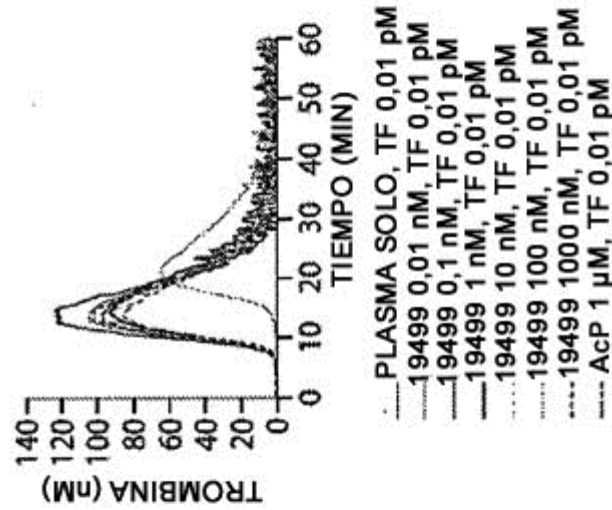


Fig. 39B

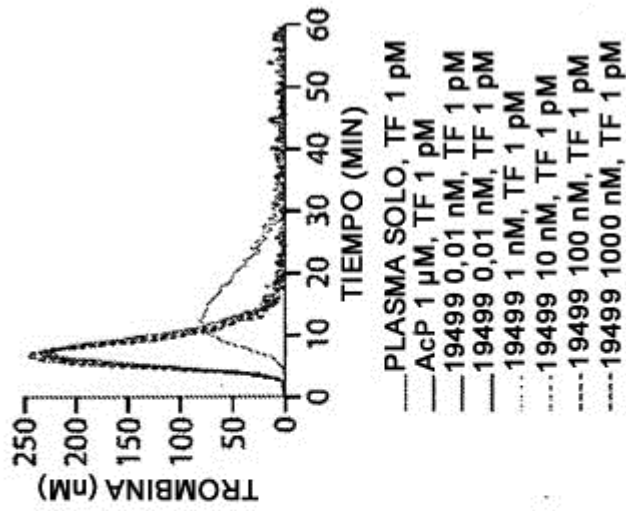


Fig. 39C

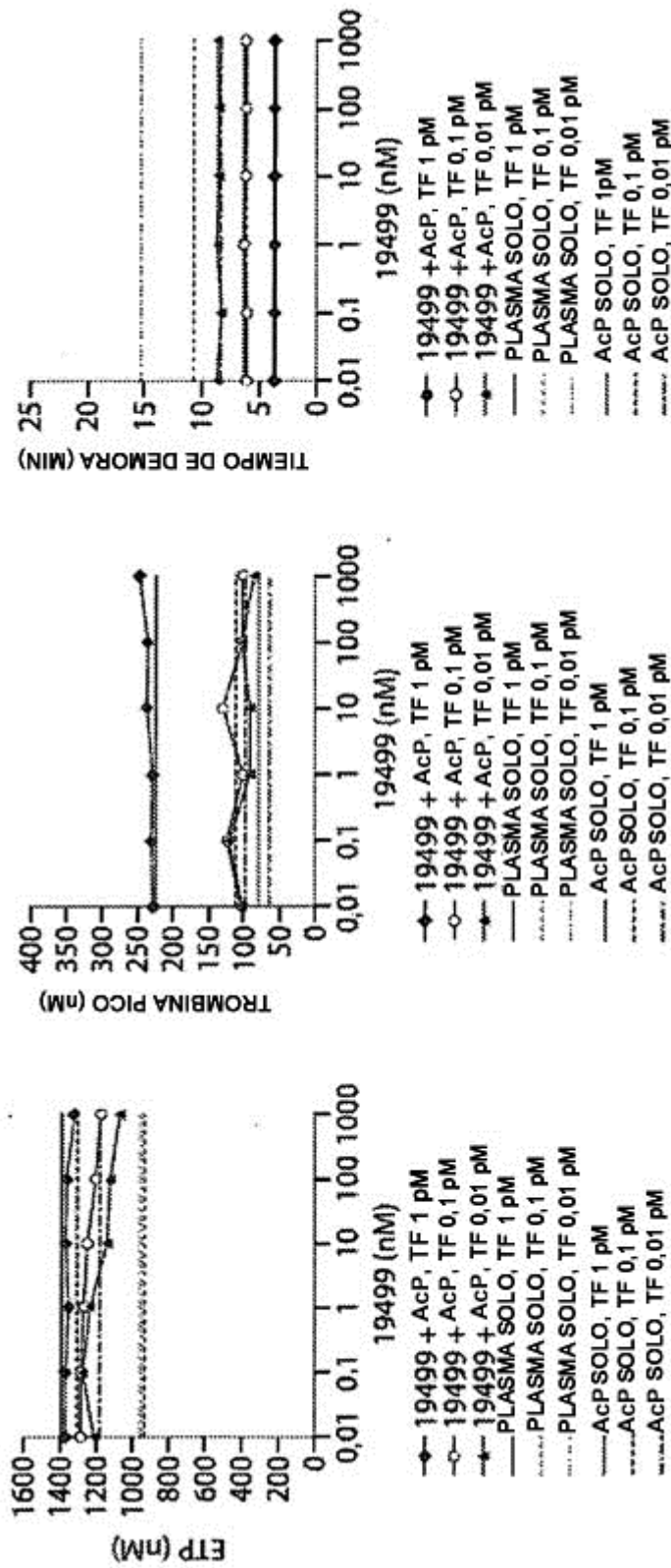


Fig. 39F

Fig. 39E

Fig. 39D

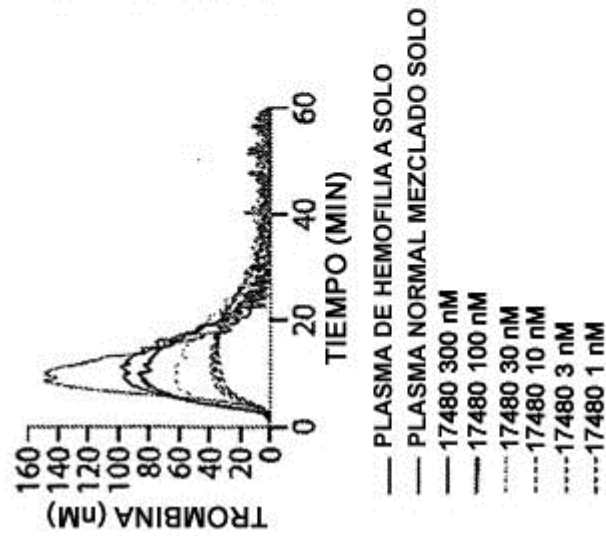


Fig. 40A

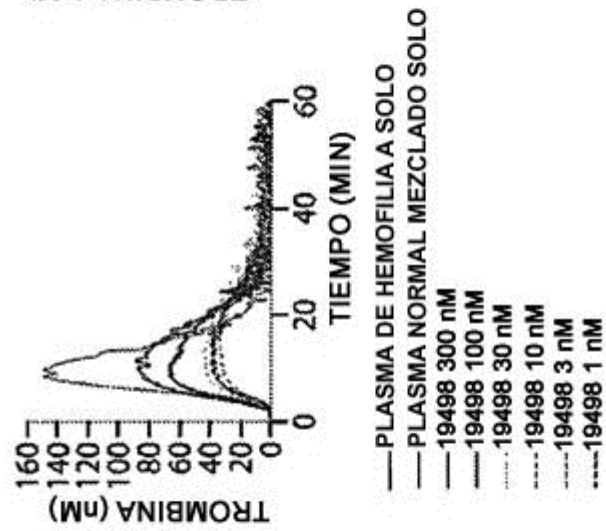


Fig. 40B

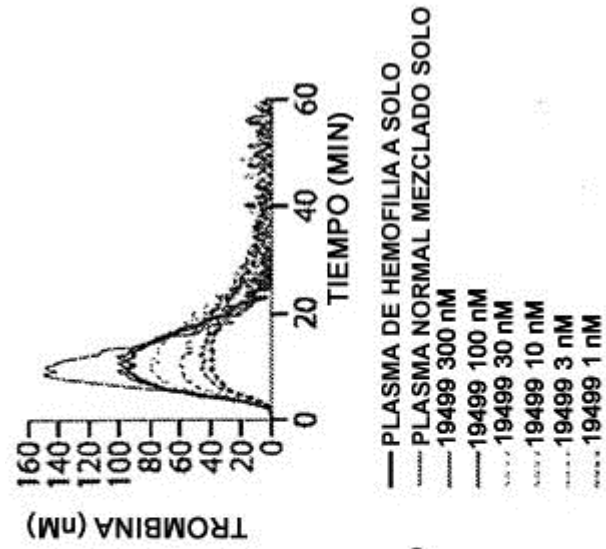


Fig. 40C

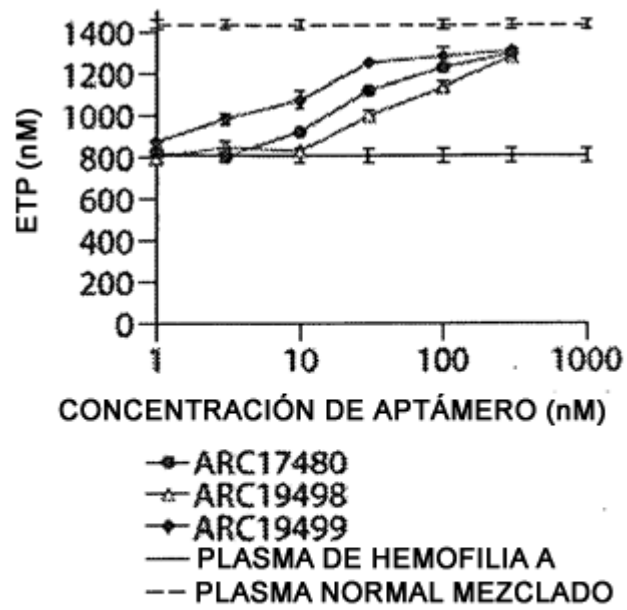


Fig. 40D

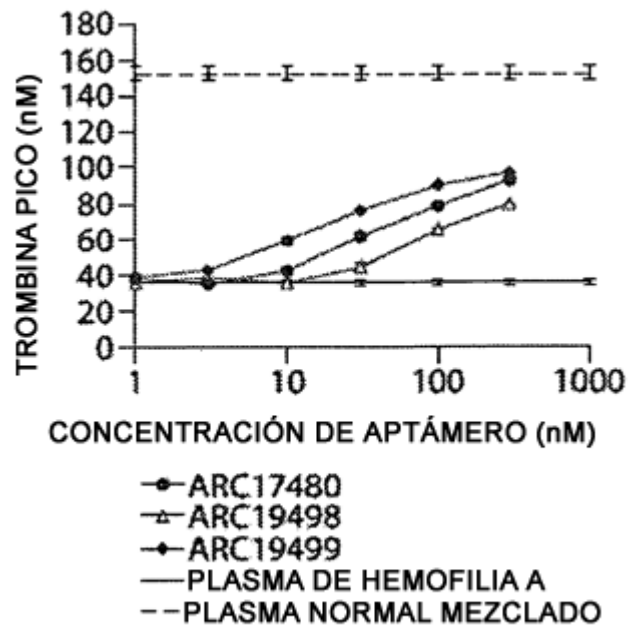


Fig. 40E

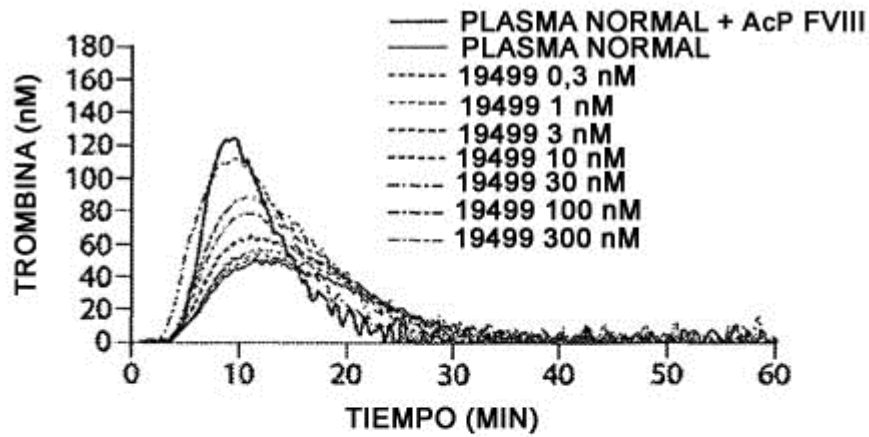


Fig. 41

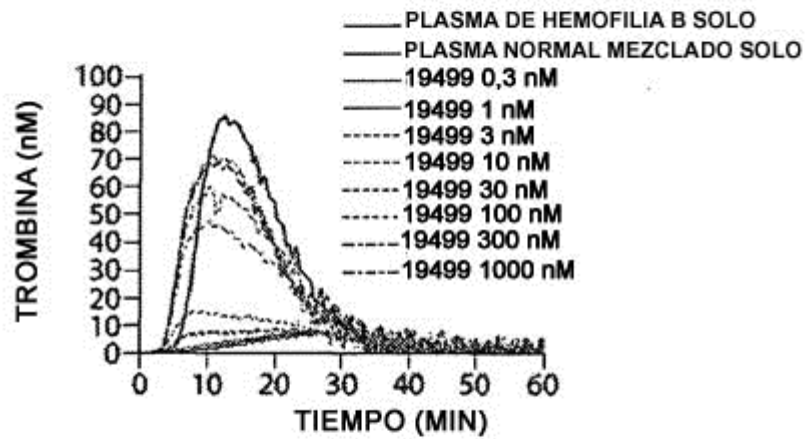


Fig. 42A

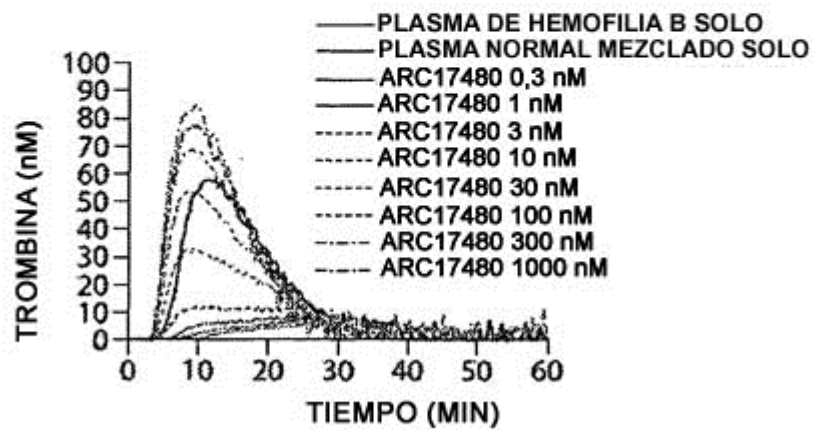


Fig. 42B

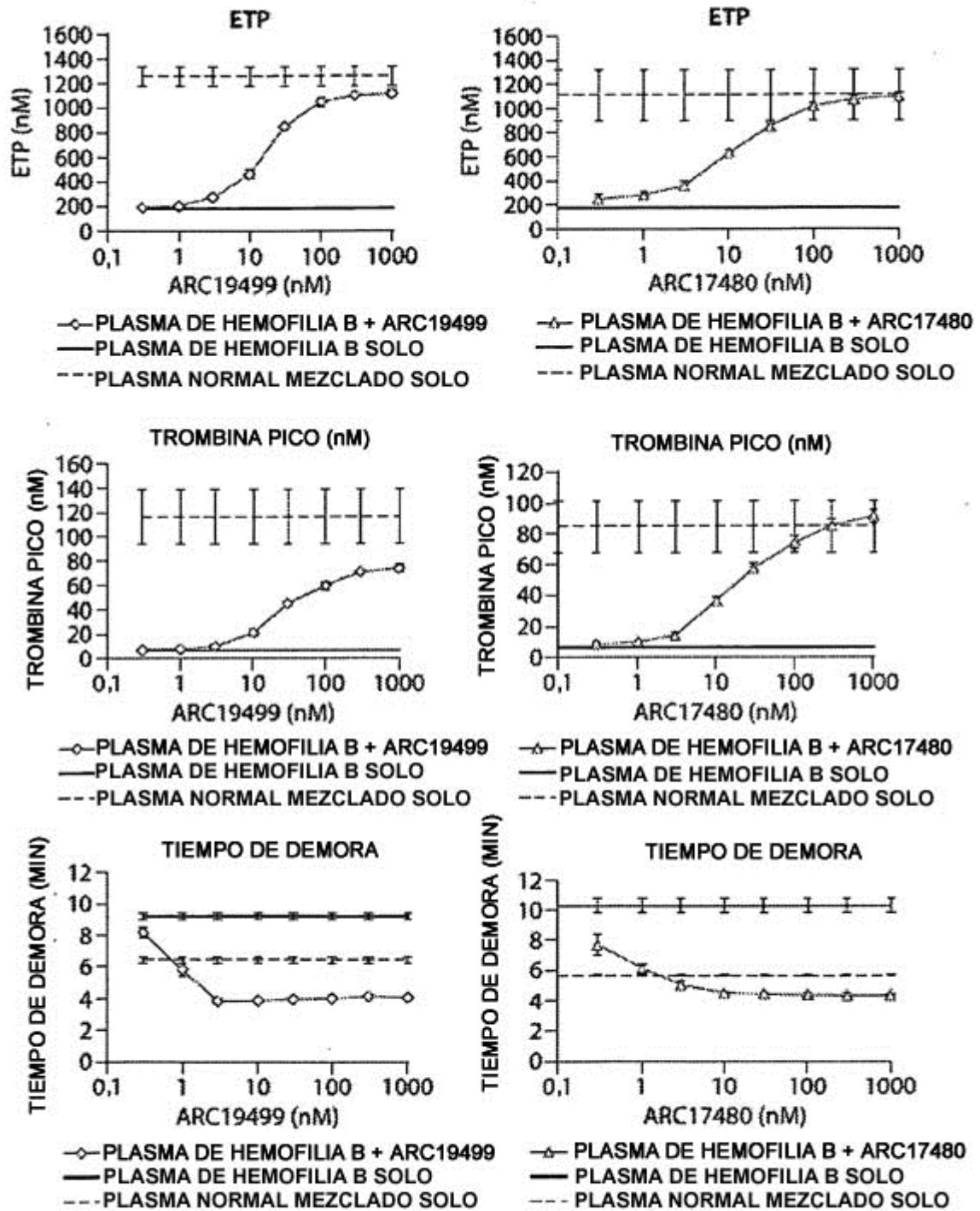


Fig. 43

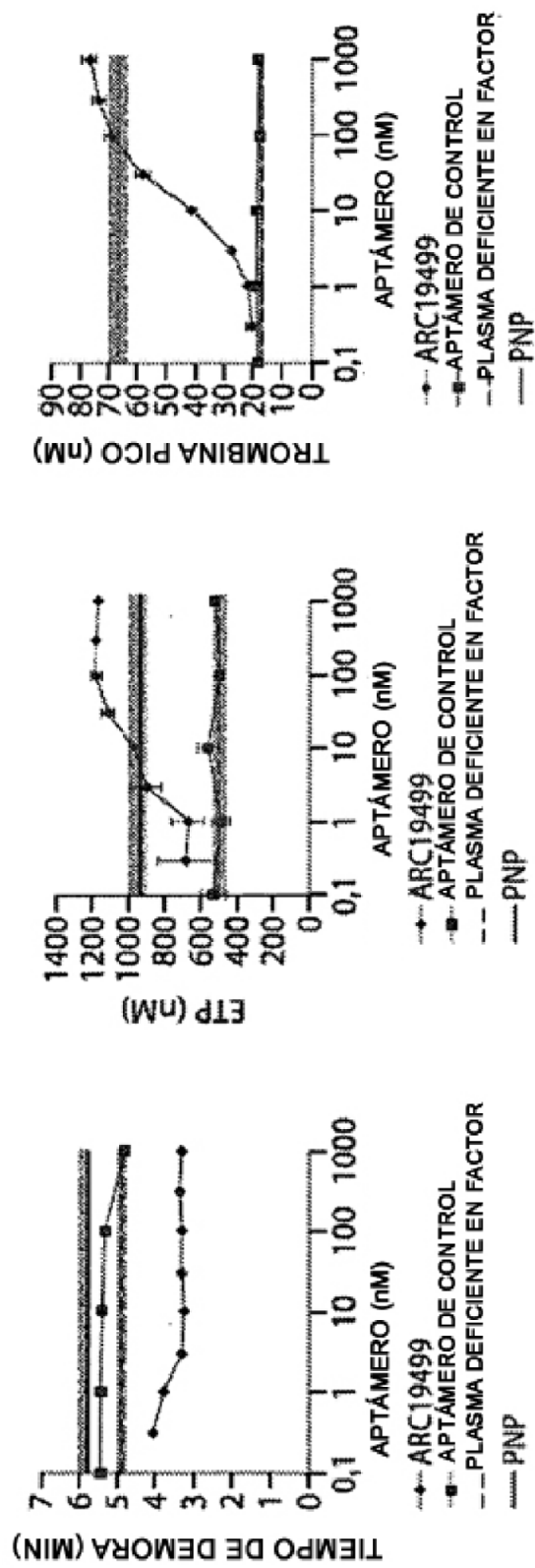


Fig. 44A

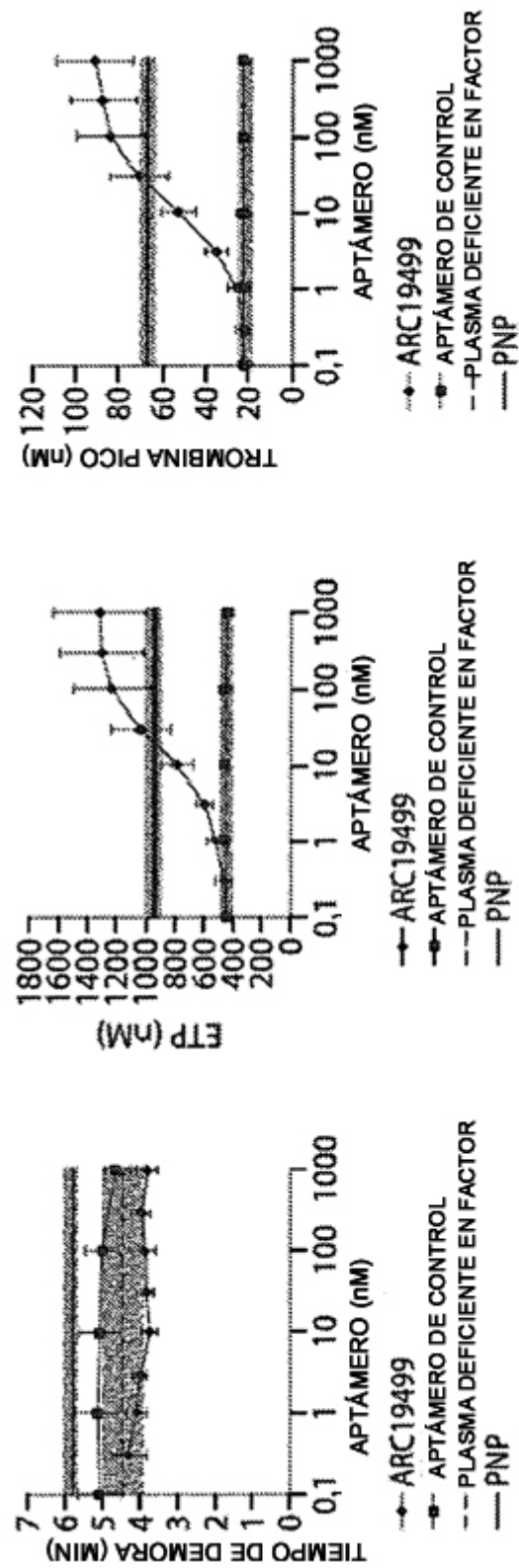


Fig. 44B

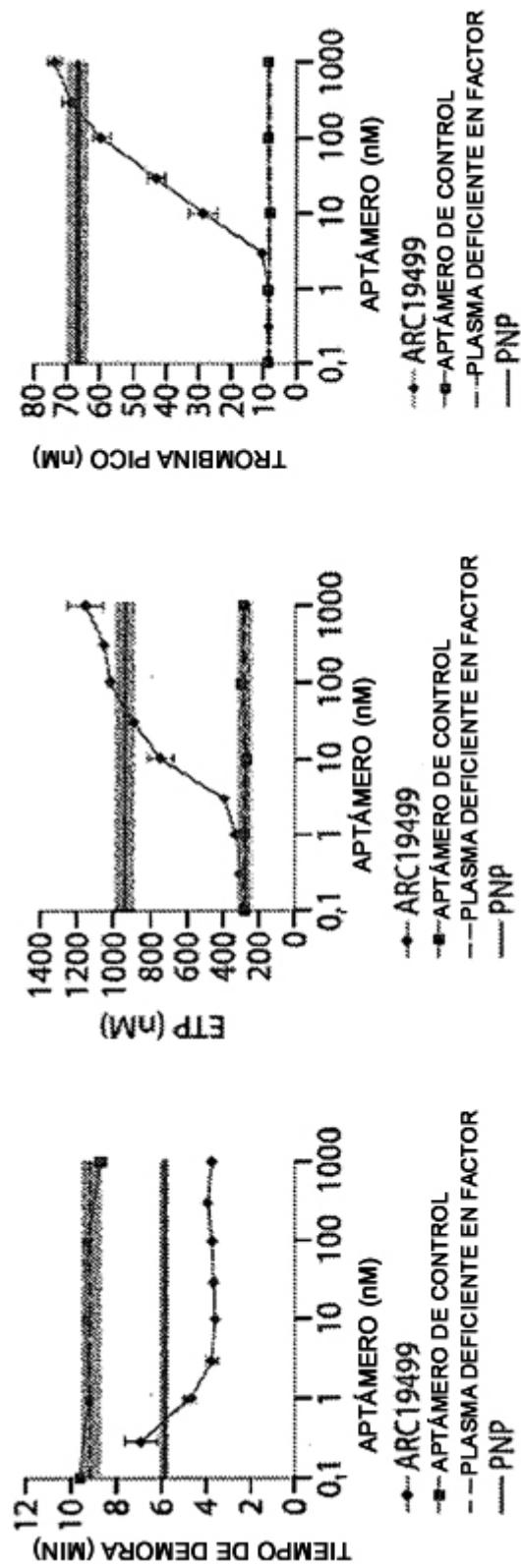


Fig. 44C

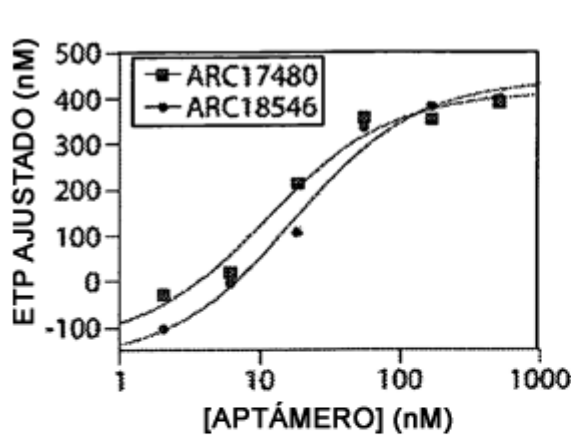


Fig. 45A

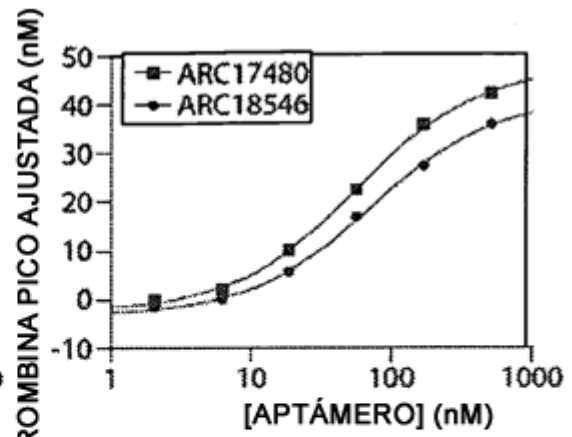


Fig. 45B

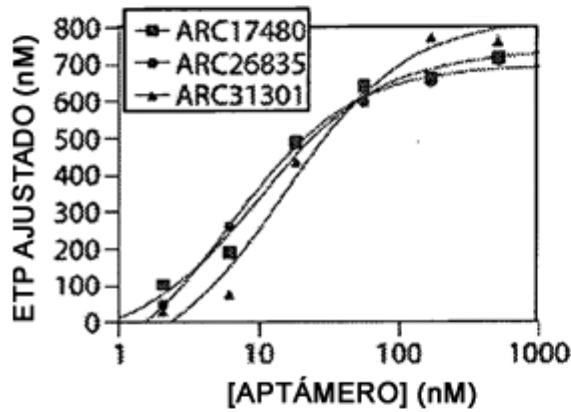


Fig. 45C

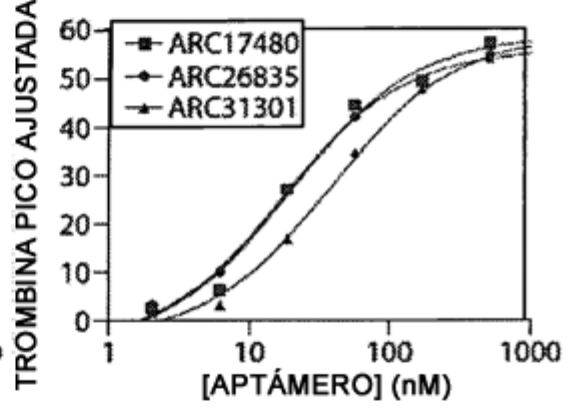


Fig. 45D

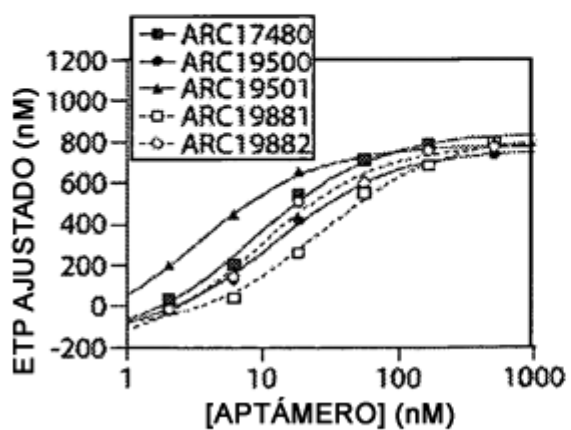


Fig. 46A

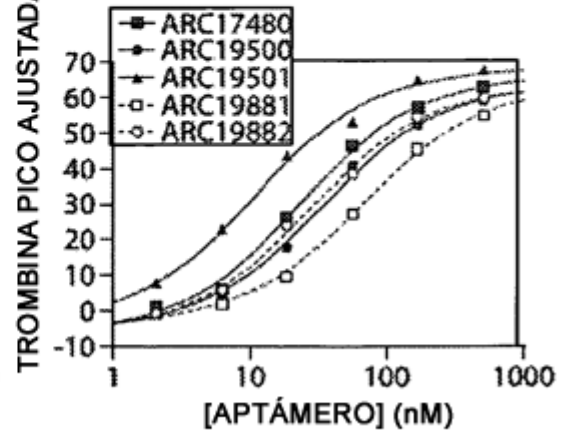


Fig. 46B

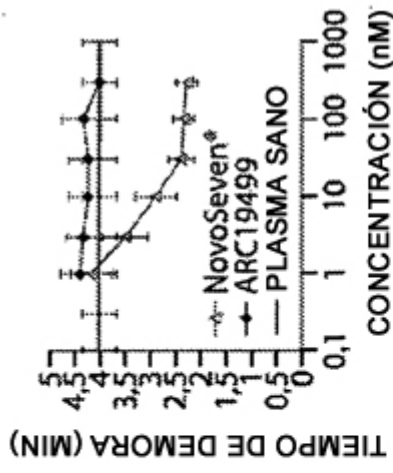


Fig. 47C

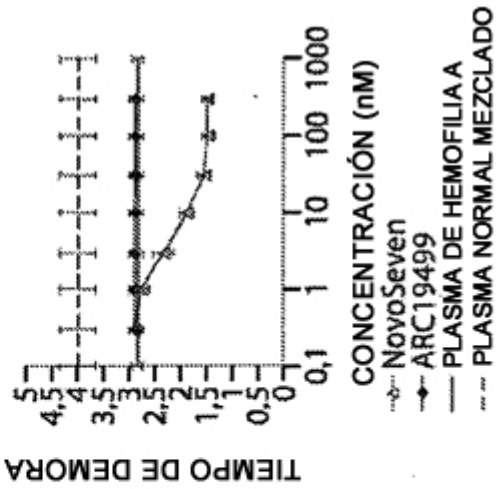


Fig. 48C

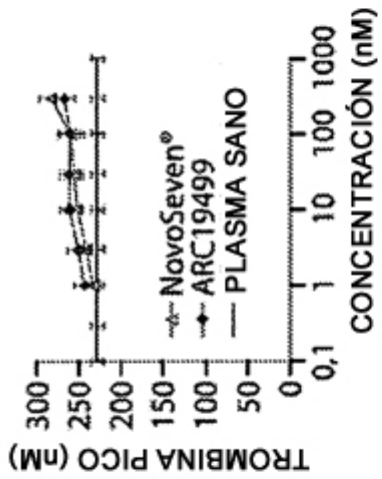


Fig. 47B

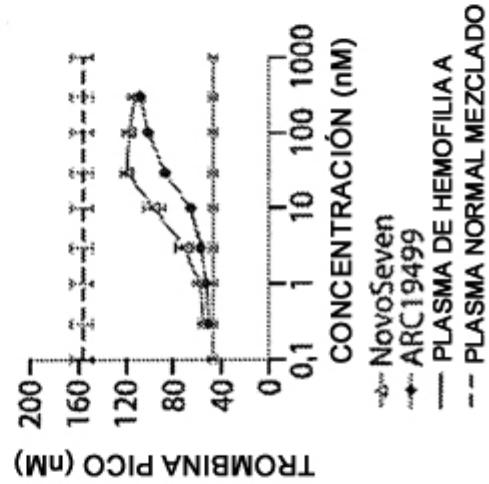


Fig. 48B

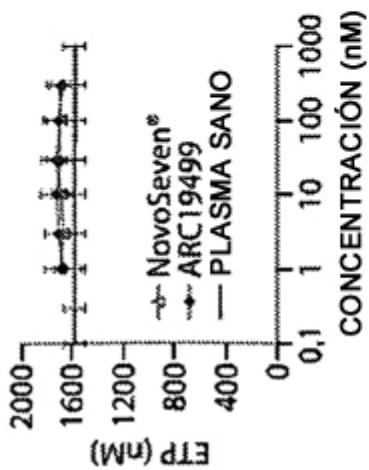


Fig. 47A

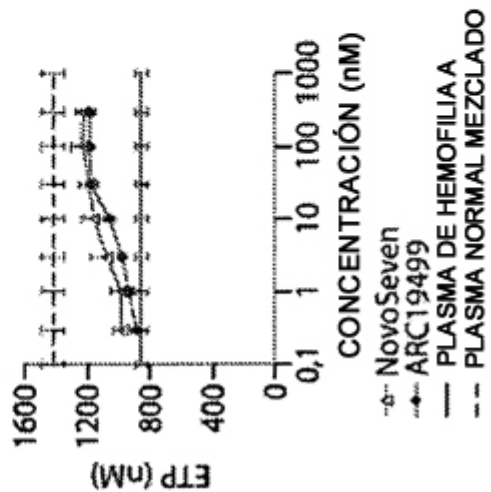


Fig. 48A

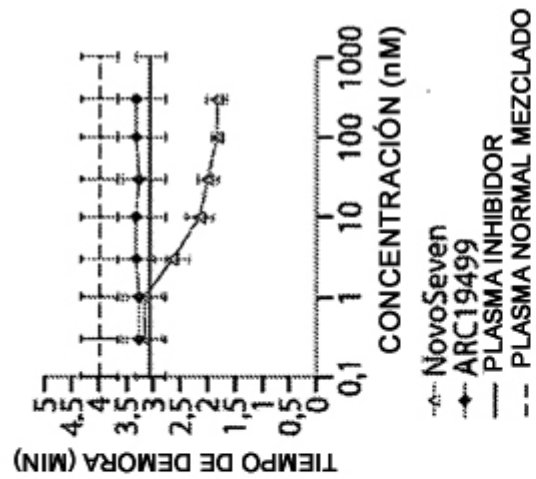


Fig. 49A

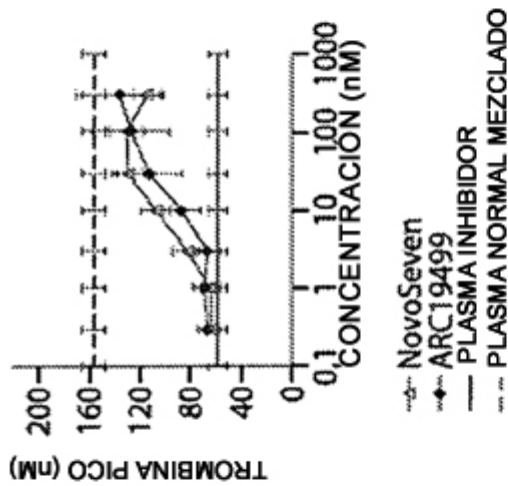


Fig. 49B

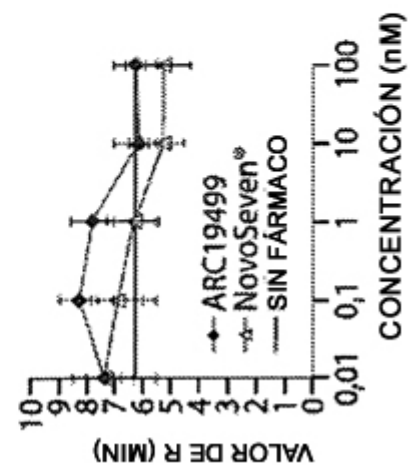


Fig. 50A

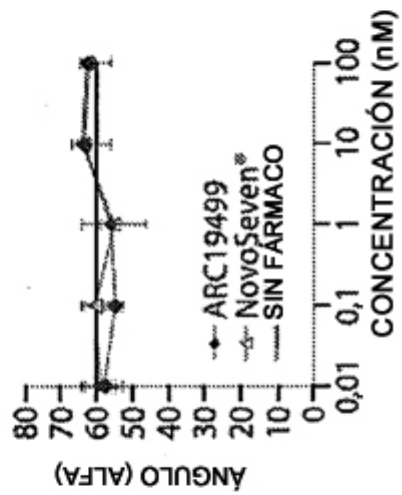


Fig. 50B

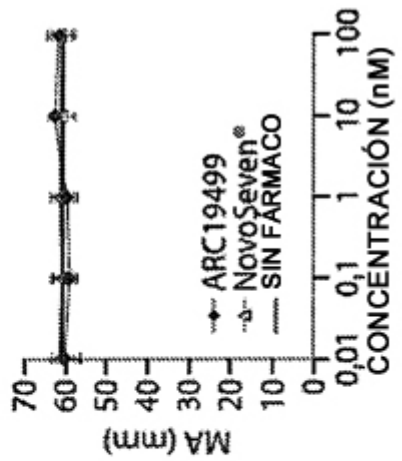


Fig. 50C

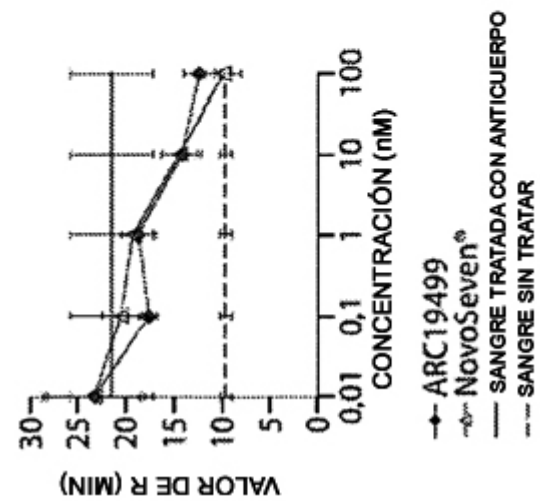


Fig. 51A

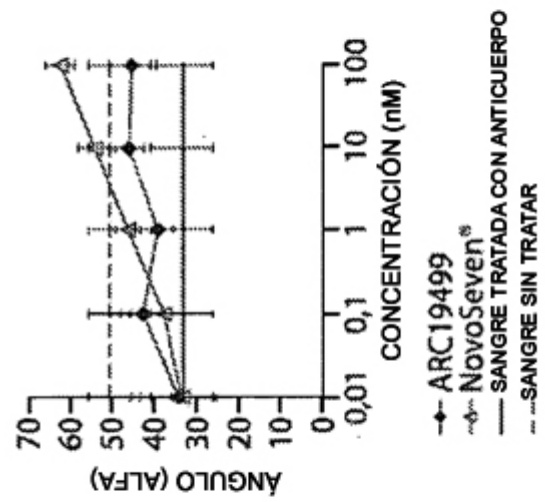


Fig. 51B

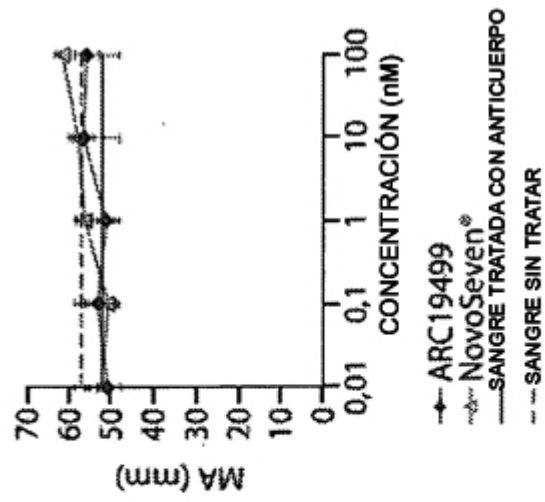
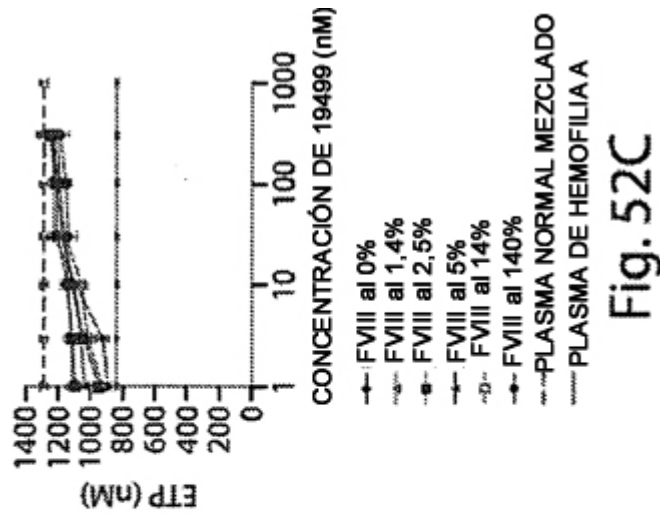
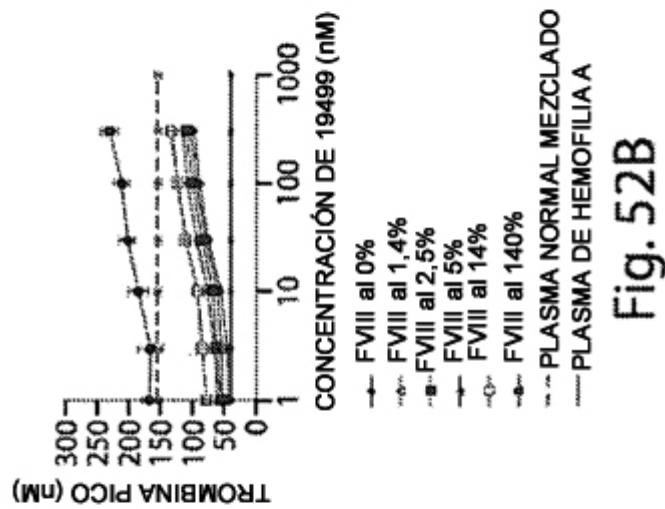
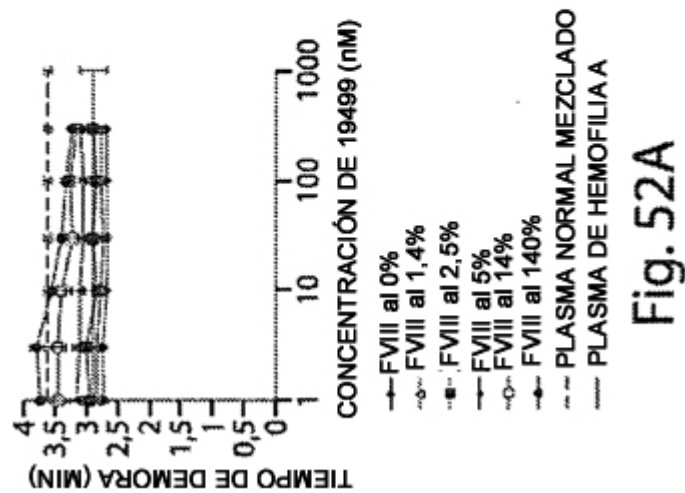


Fig. 51C



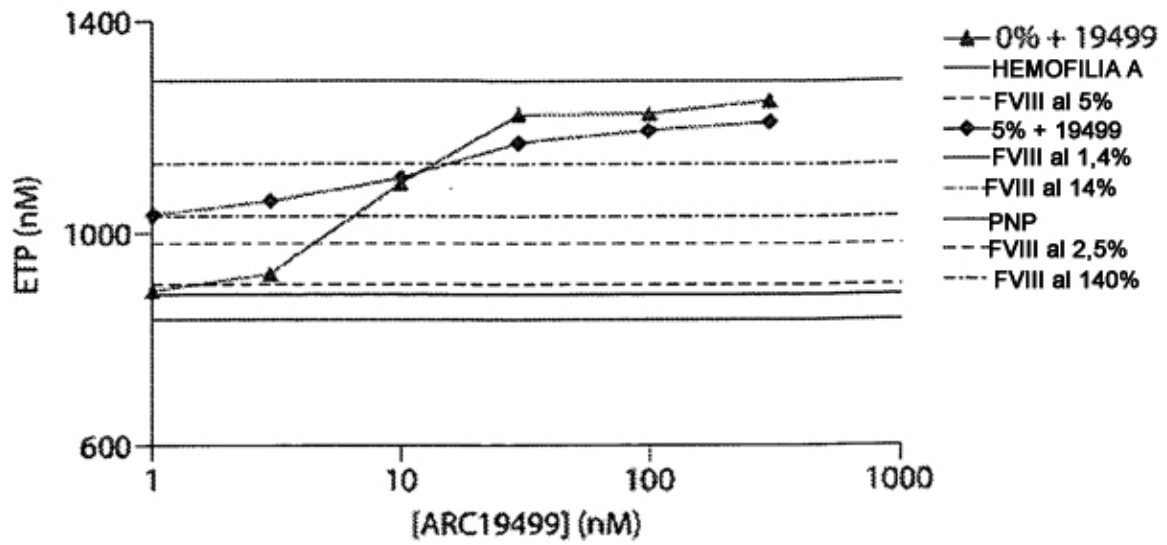


Fig. 53A

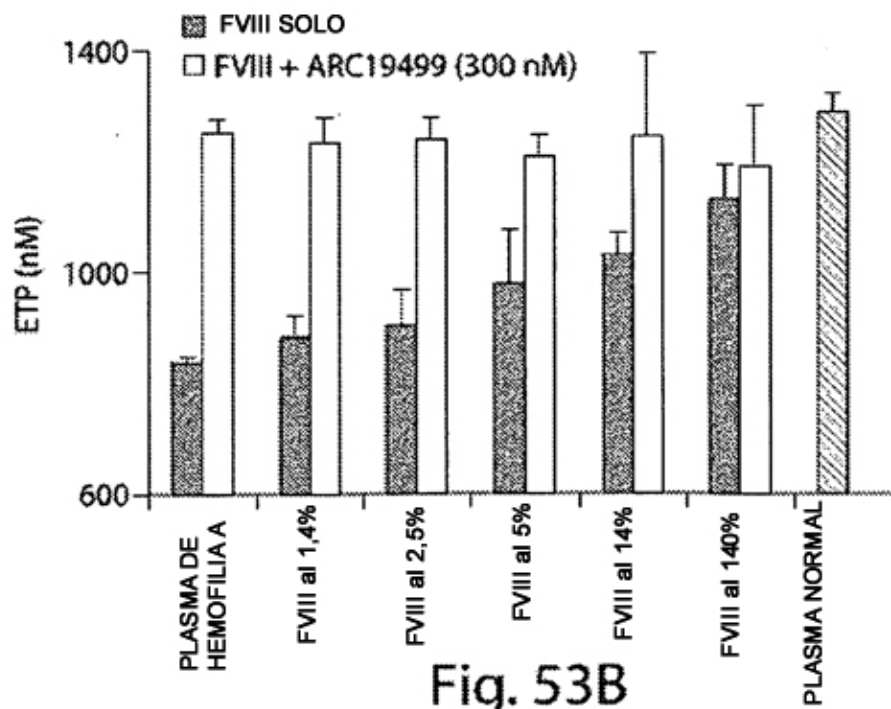


Fig. 53B

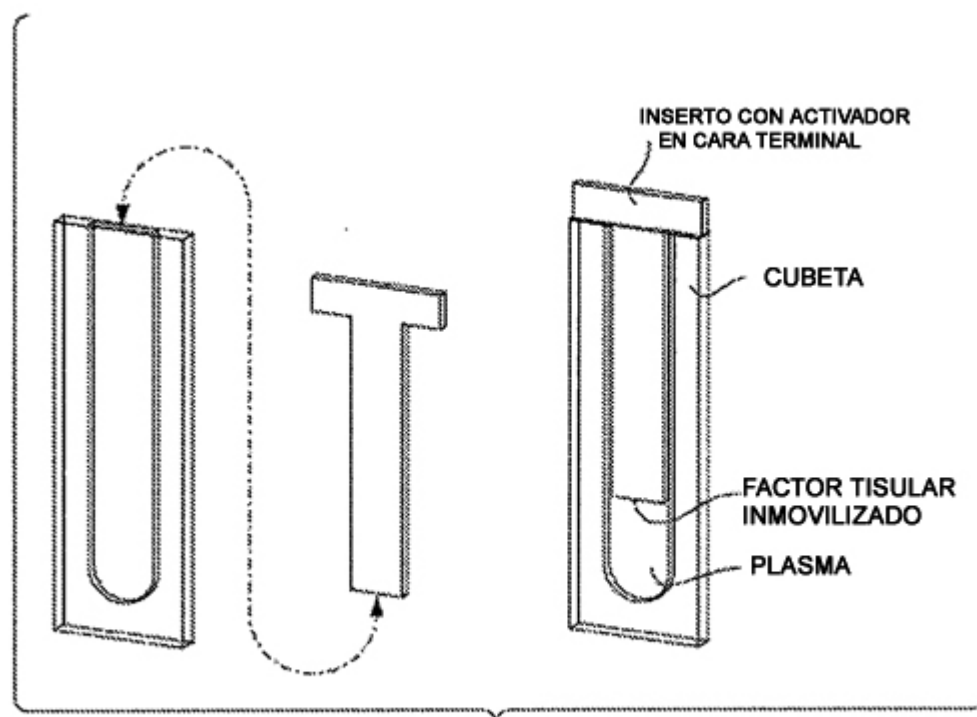


Fig. 54A

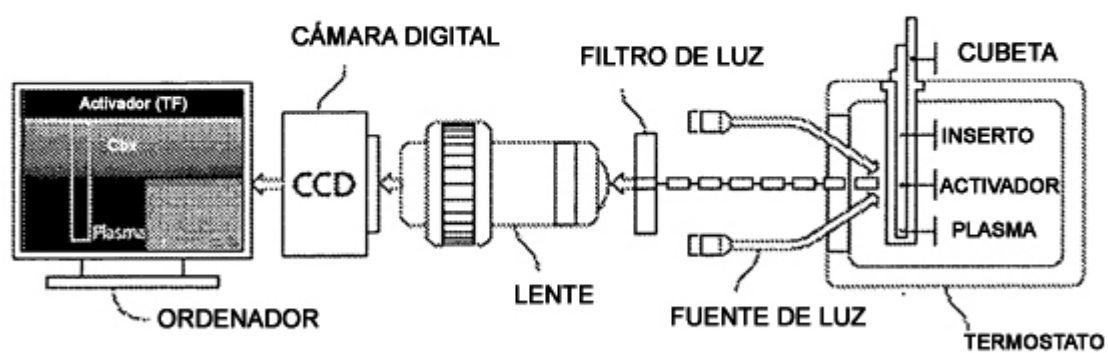


Fig. 54B

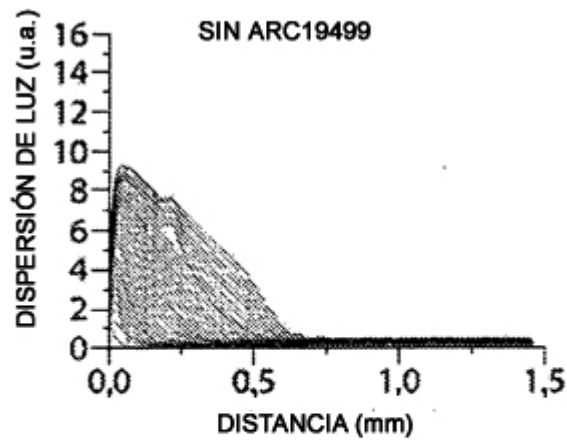


Fig. 55A

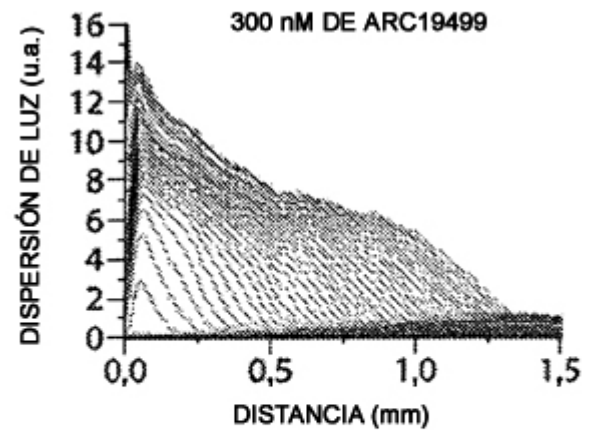


Fig. 55B

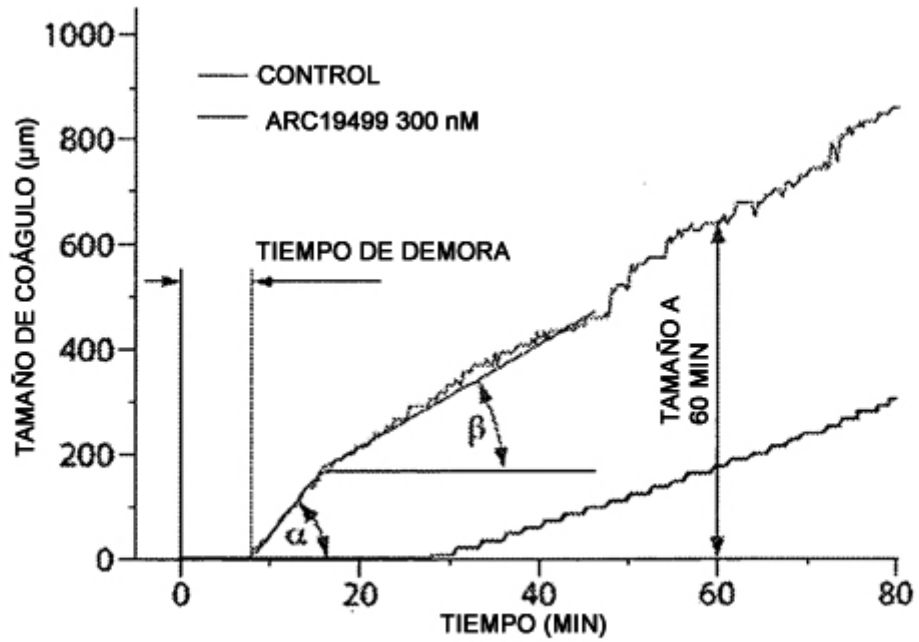


Fig. 56

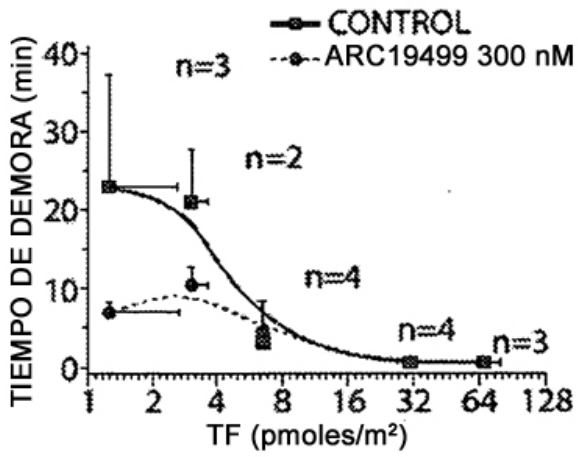


Fig. 57A

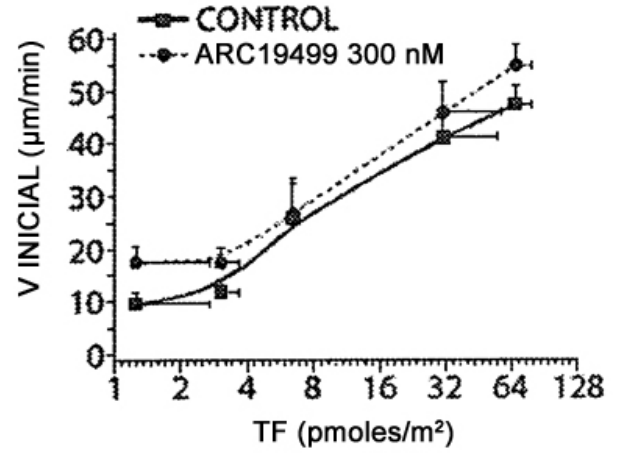


Fig. 57B

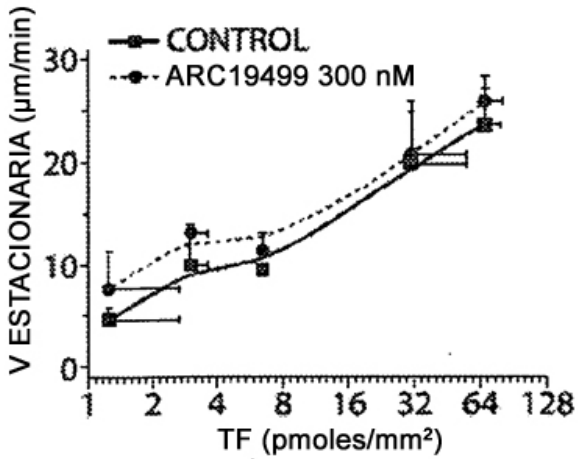


Fig. 57C

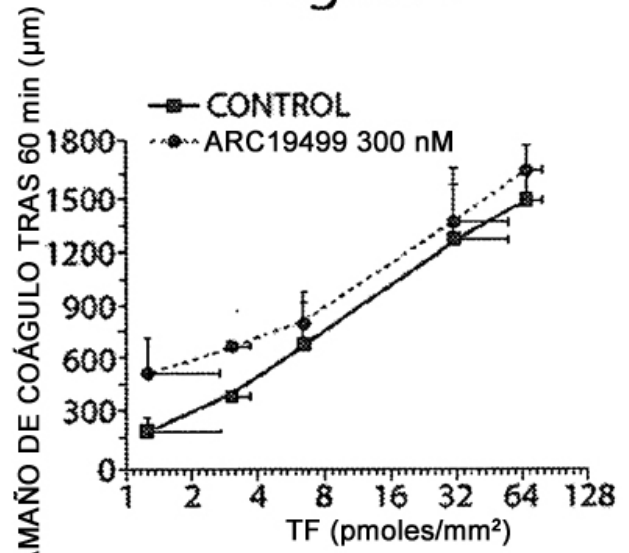


Fig. 57D

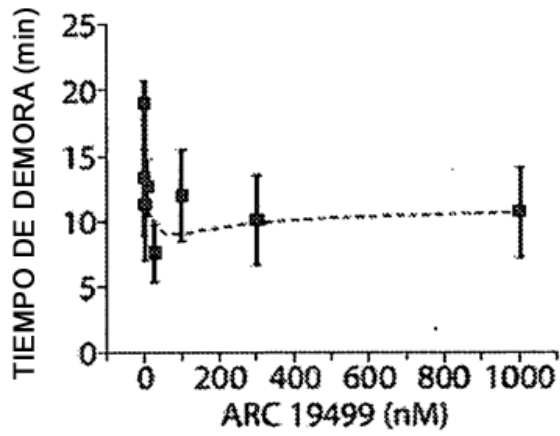


Fig. 58A

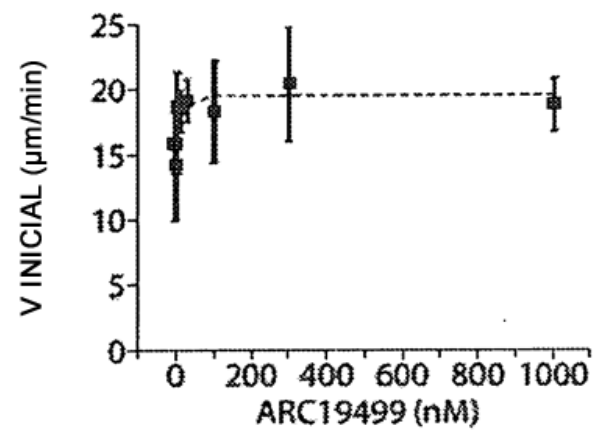


Fig. 58B

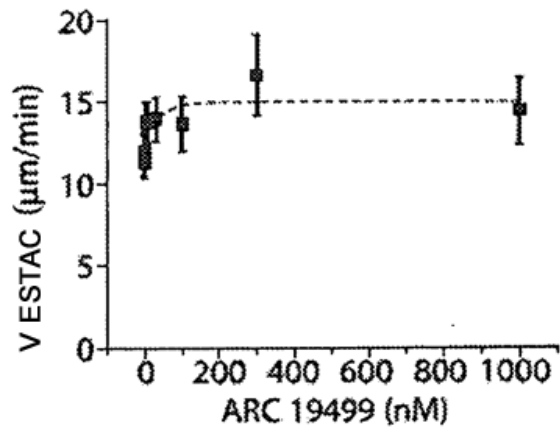


Fig. 58C

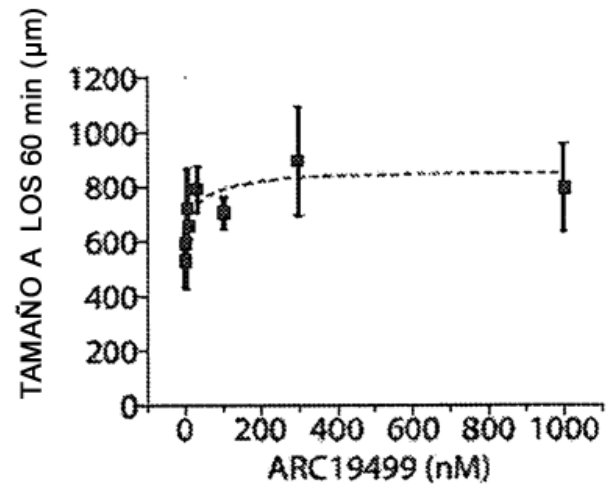


Fig. 58D

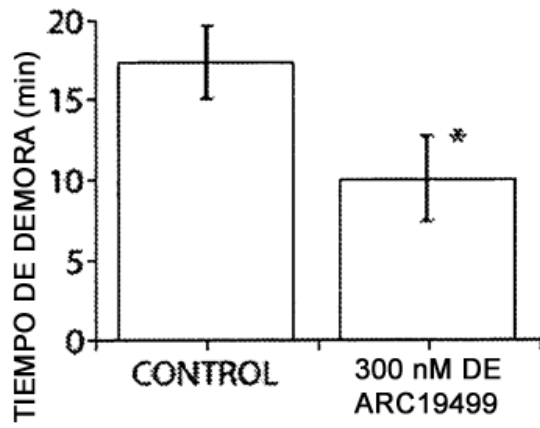


Fig. 59A

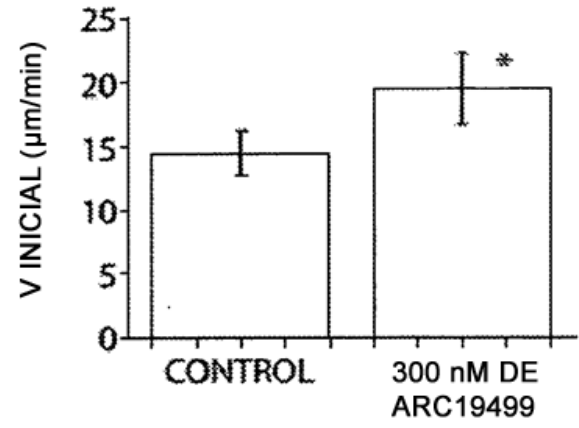


Fig. 59B

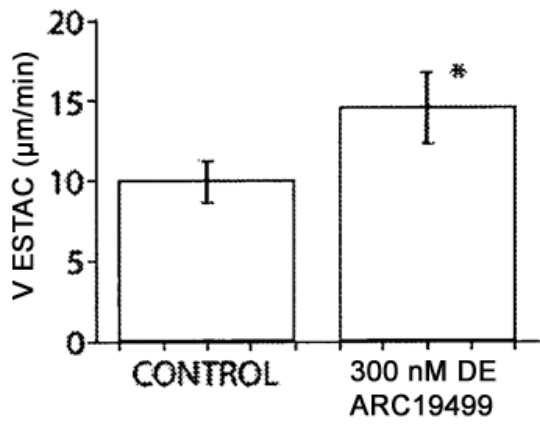


Fig. 59C

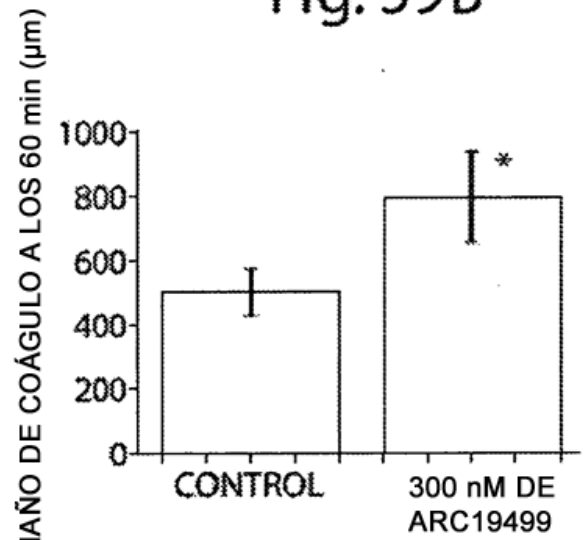


Fig. 59D

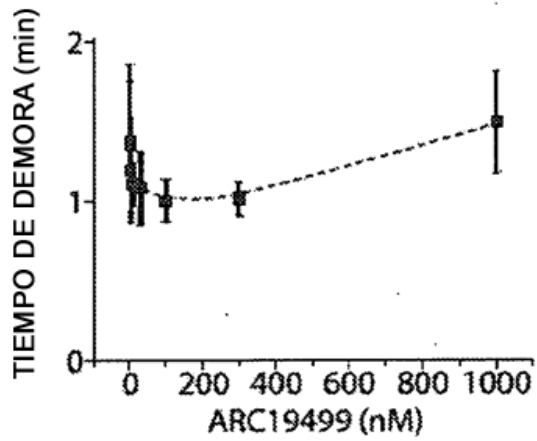


Fig. 60A

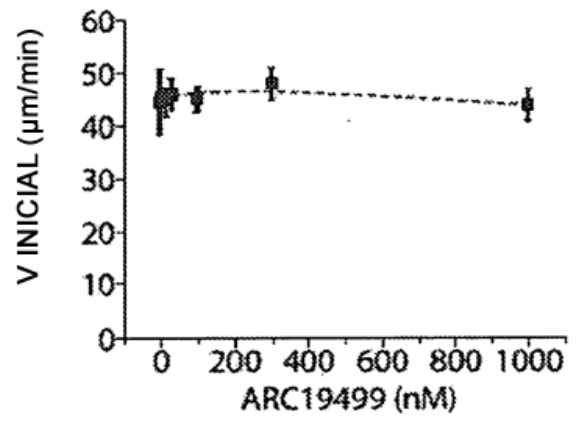


Fig. 60B

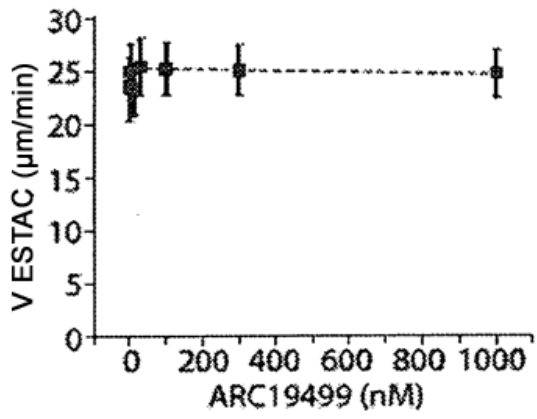


Fig. 60C

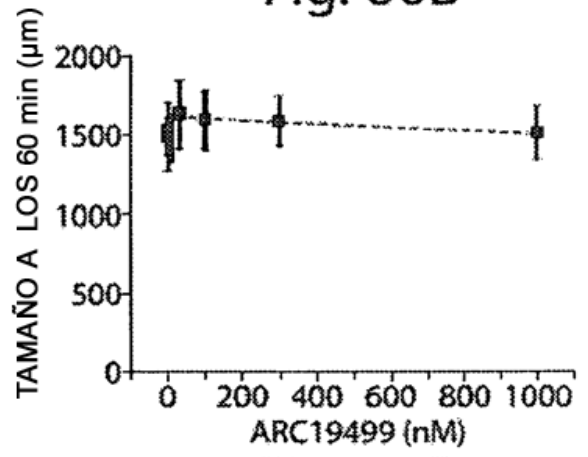


Fig. 60D

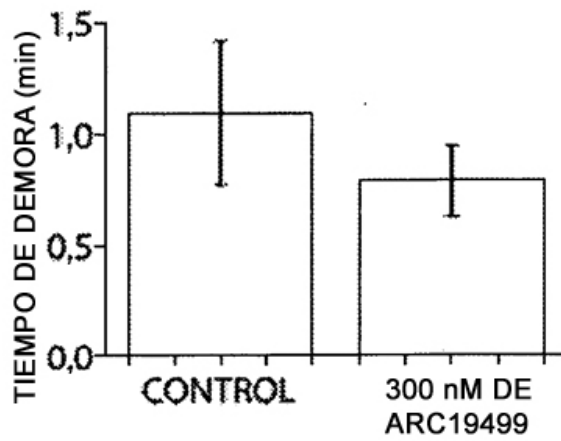


Fig. 61A

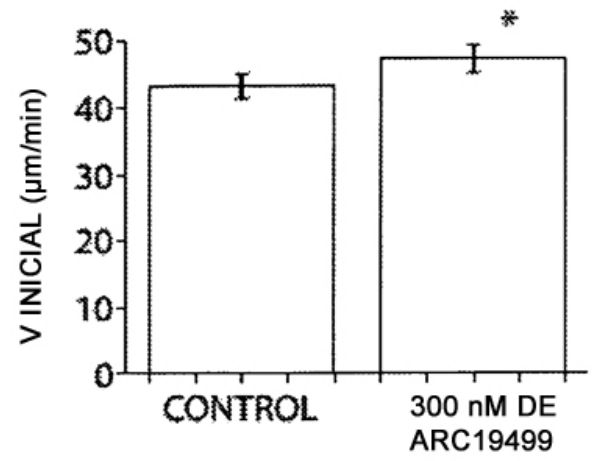


Fig. 61B

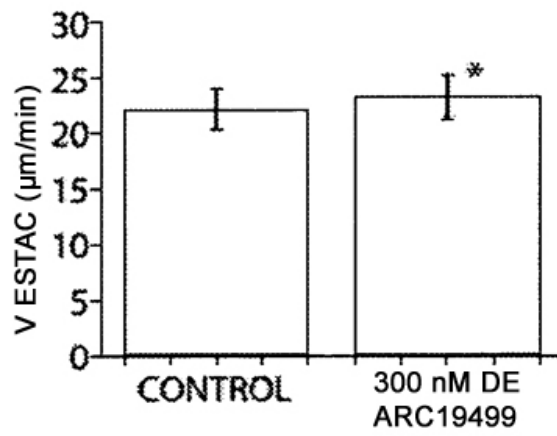


Fig. 61C

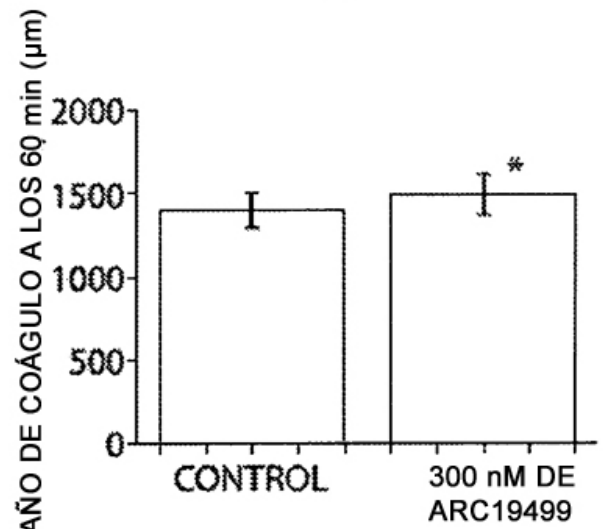


Fig. 61D

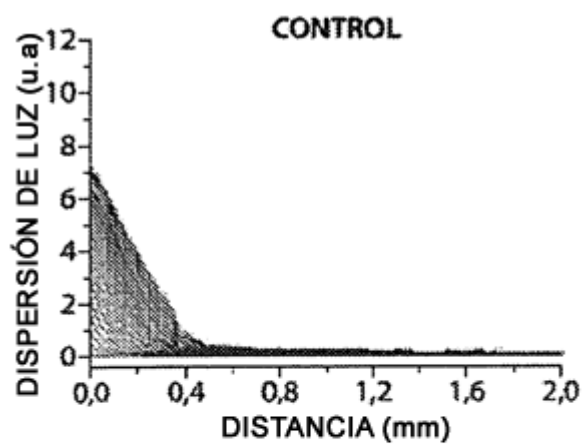


Fig. 62A

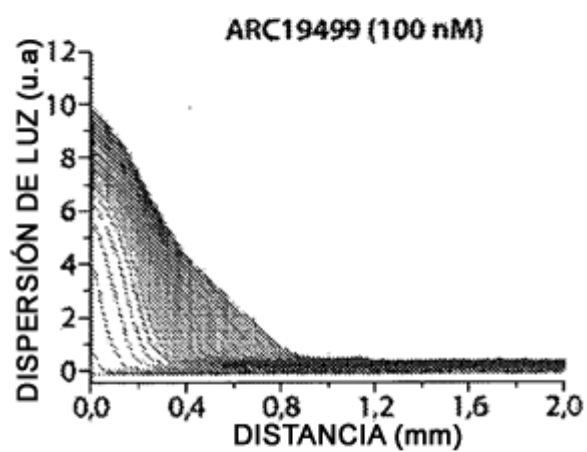


Fig. 62B

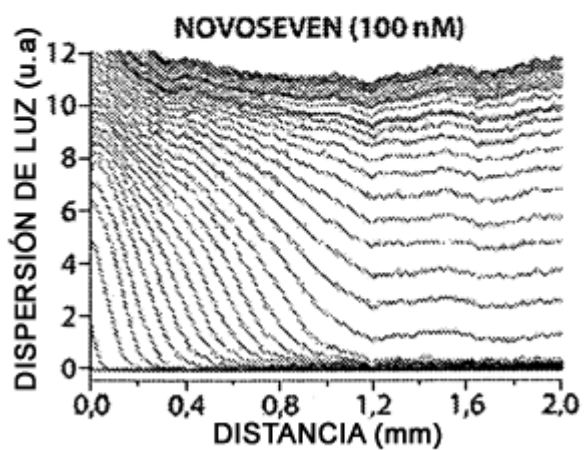


Fig. 62C

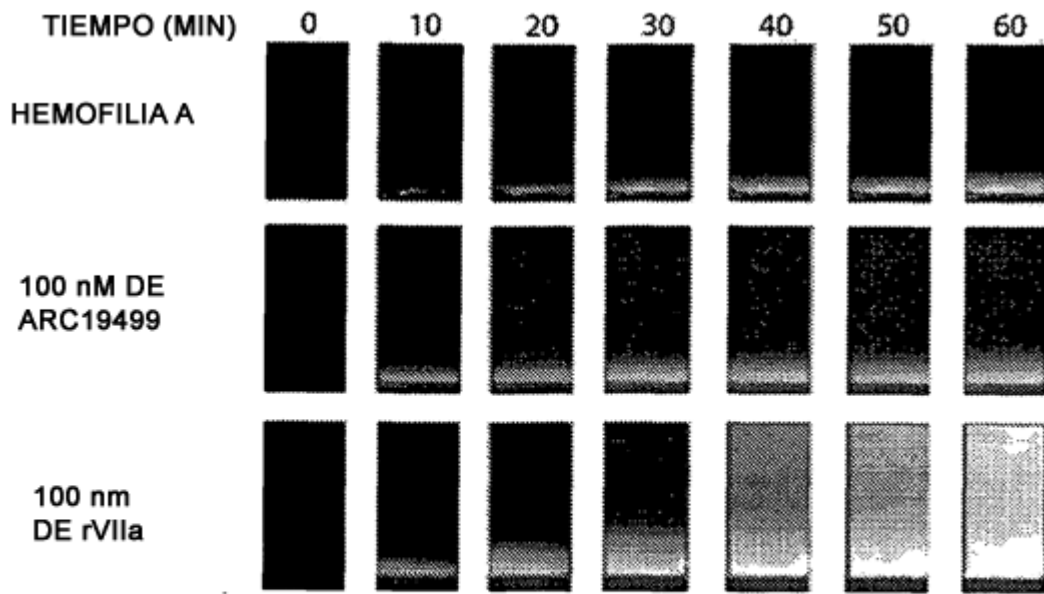


Fig. 63

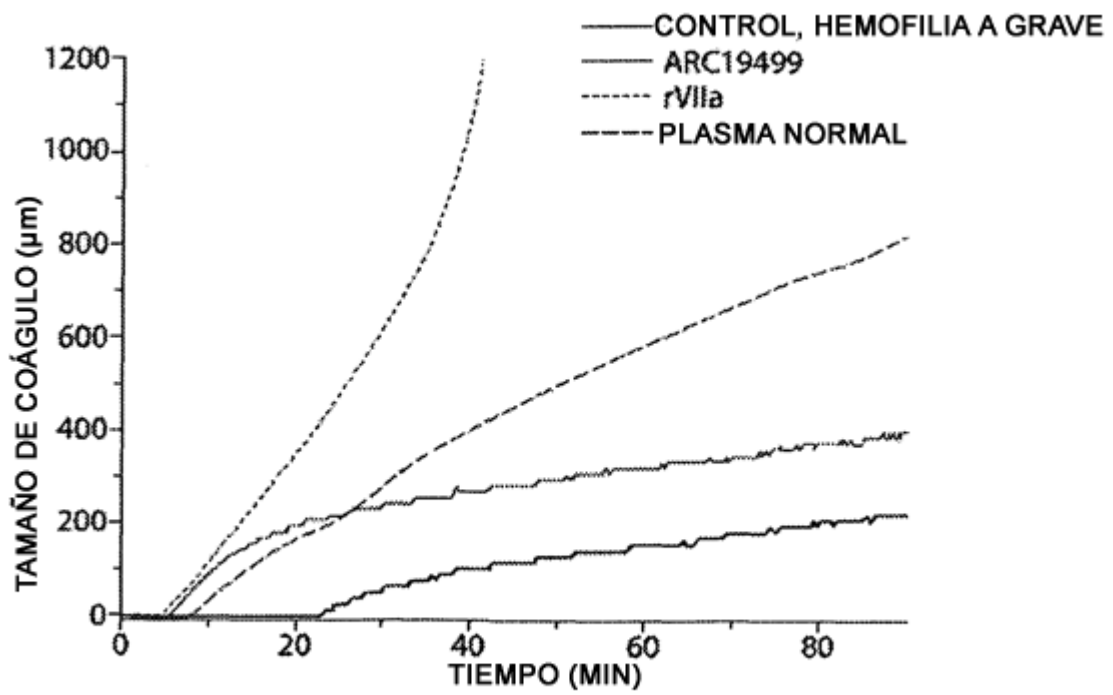


Fig. 64

NÚMERO DE PACIENTE	EDAD	ACONTECIMIENTOS HEMORRÁGICOS MENSUALES	NIVEL DE FACTOR VIII EN EL DÍA DEL EXPERIMENTO, %	APTT, s
1	21	0-1	<1	103
2	24	1-2	2,1	82
3	43	1-2	1,2	86
4	48	1-2	1,4	80
5	21	1-2	<1	120
6	36	2-3	<1	102
7	19	3-5	2,8	99
8	30	0-1	<1	124

Fig. 65

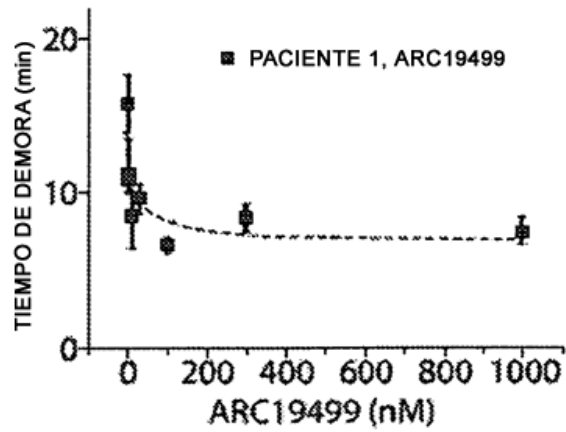


Fig. 66A

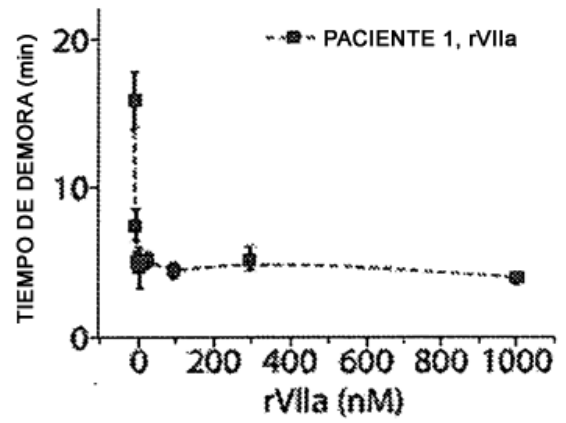


Fig. 66B

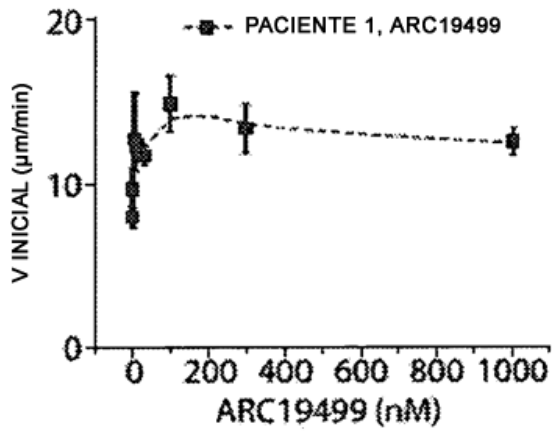


Fig. 66C

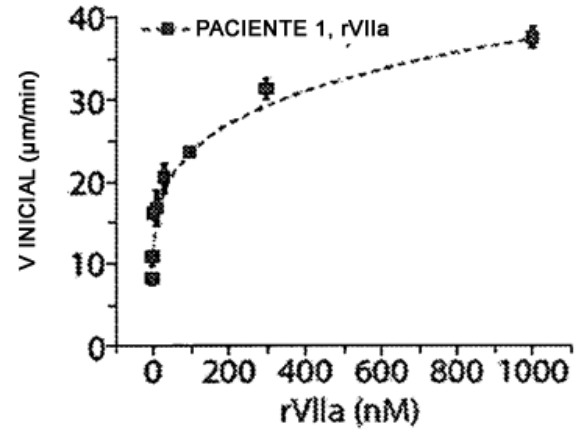


Fig. 66D

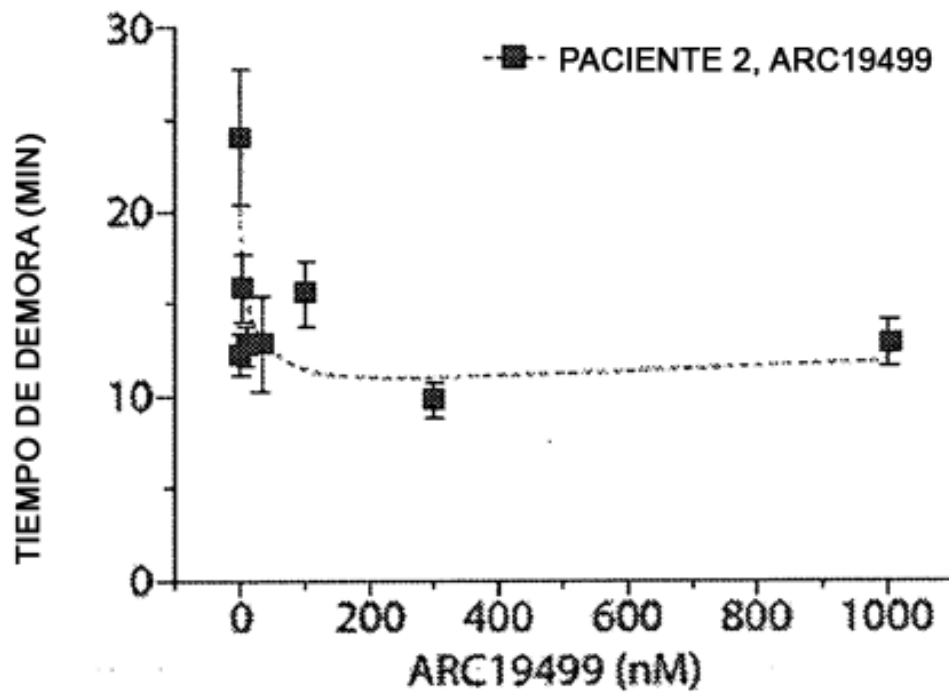


Fig. 67A

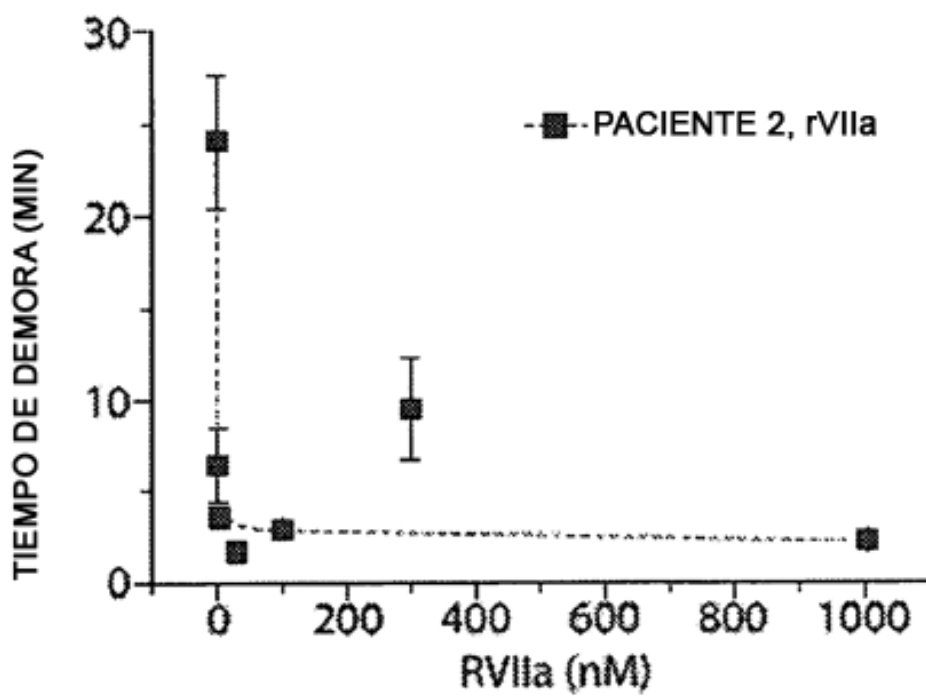


Fig. 67B

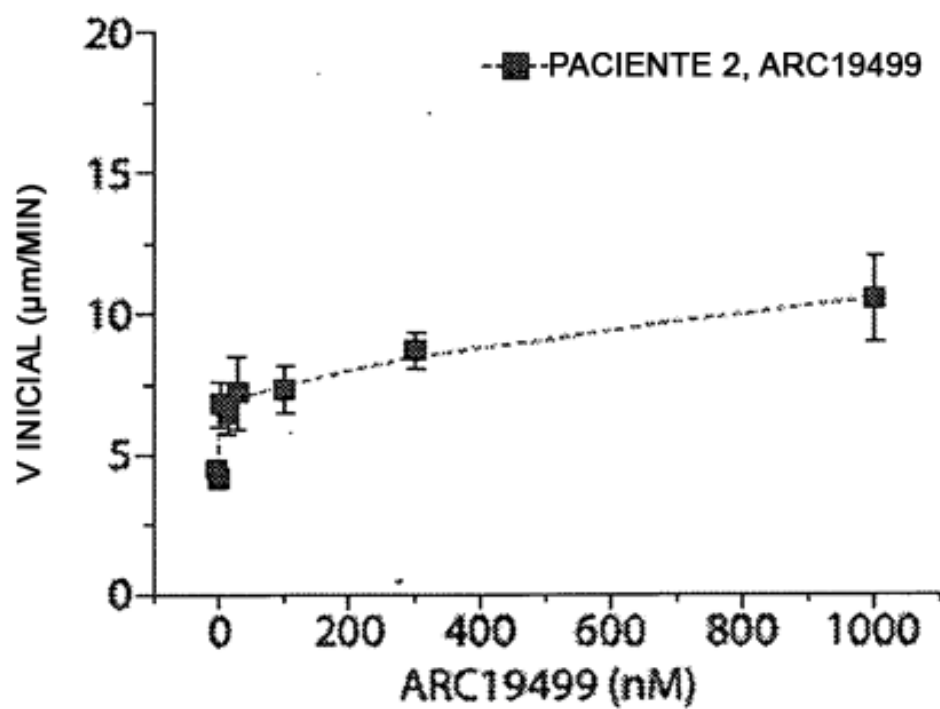


Fig. 67C

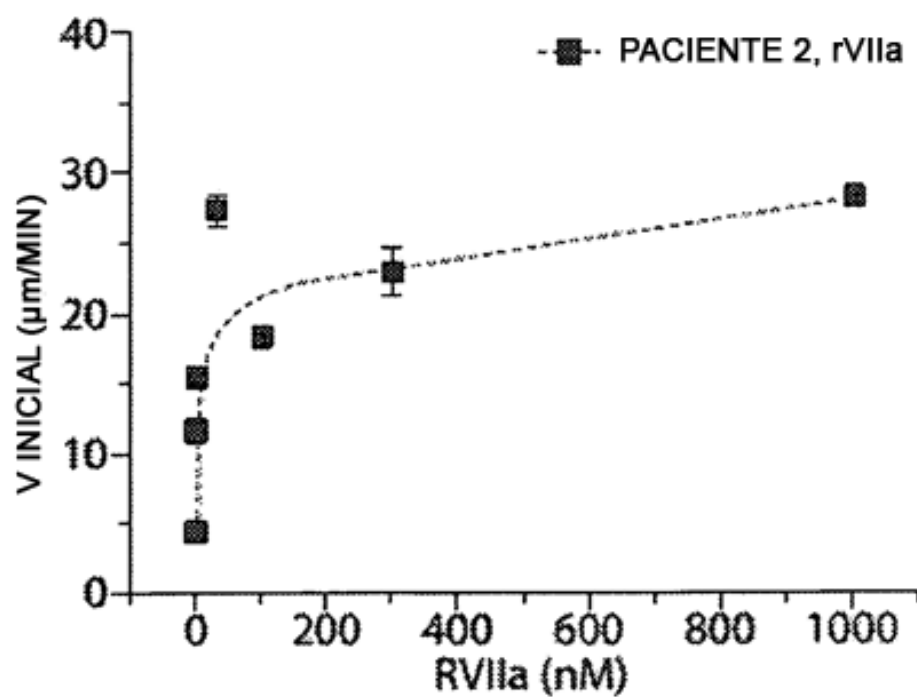


Fig. 67D

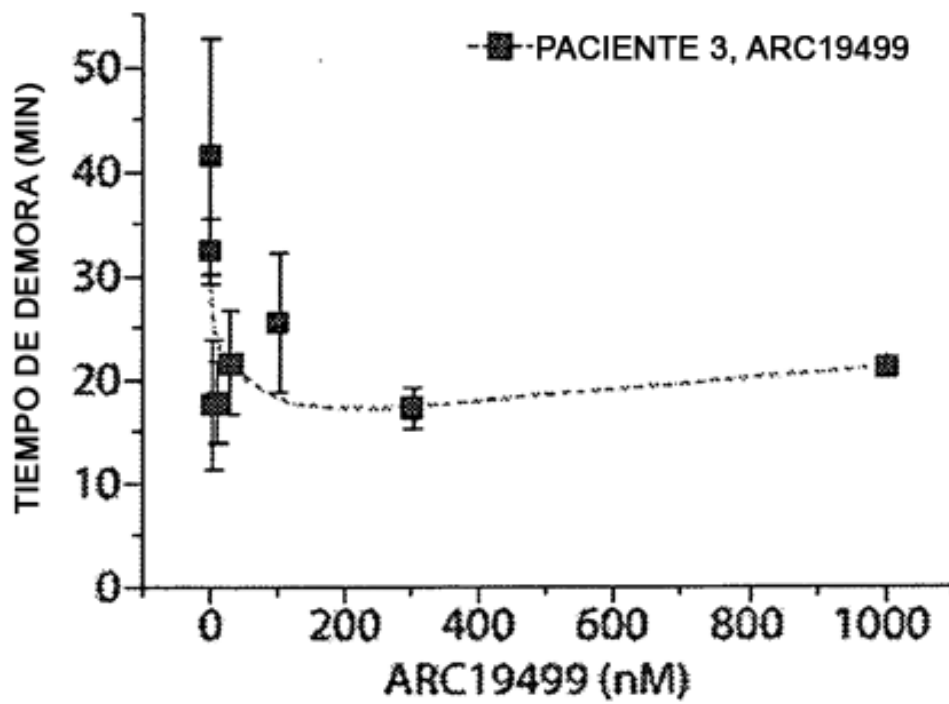


Fig. 68A

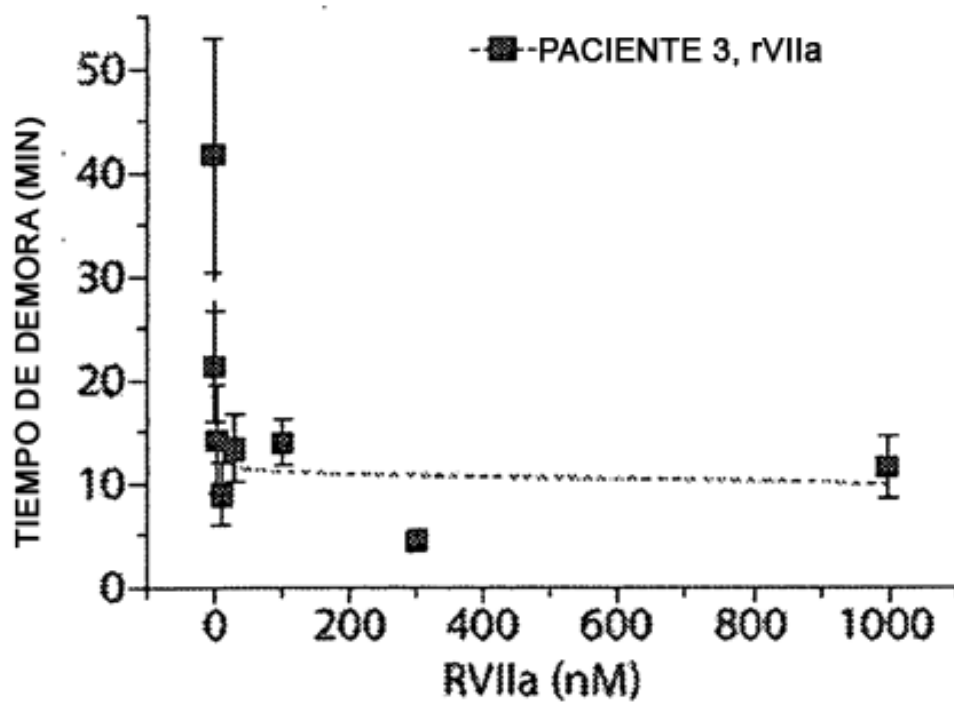


Fig. 68B

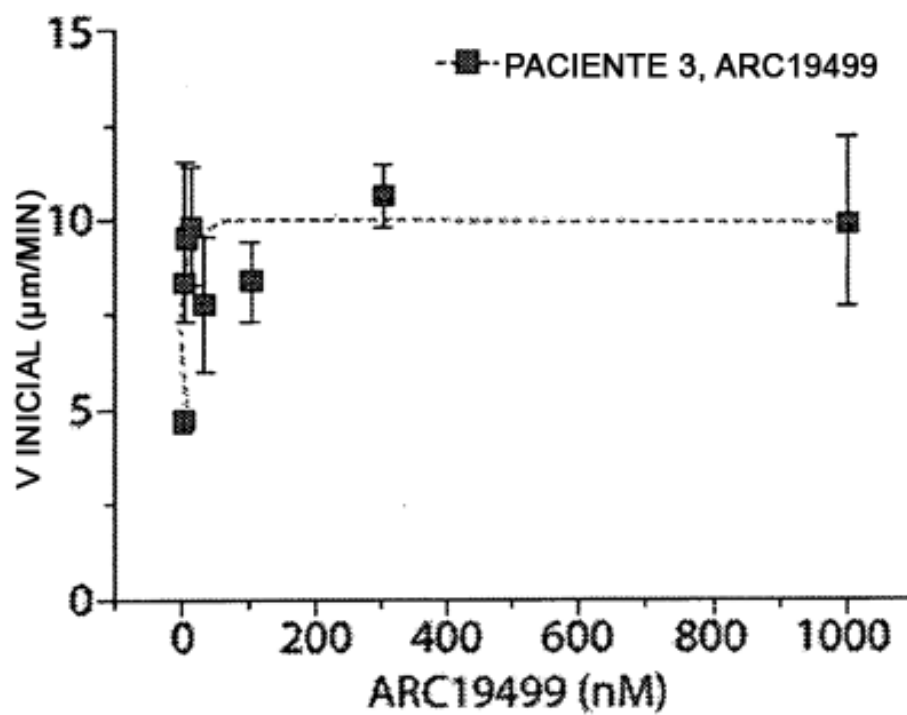


Fig. 68C

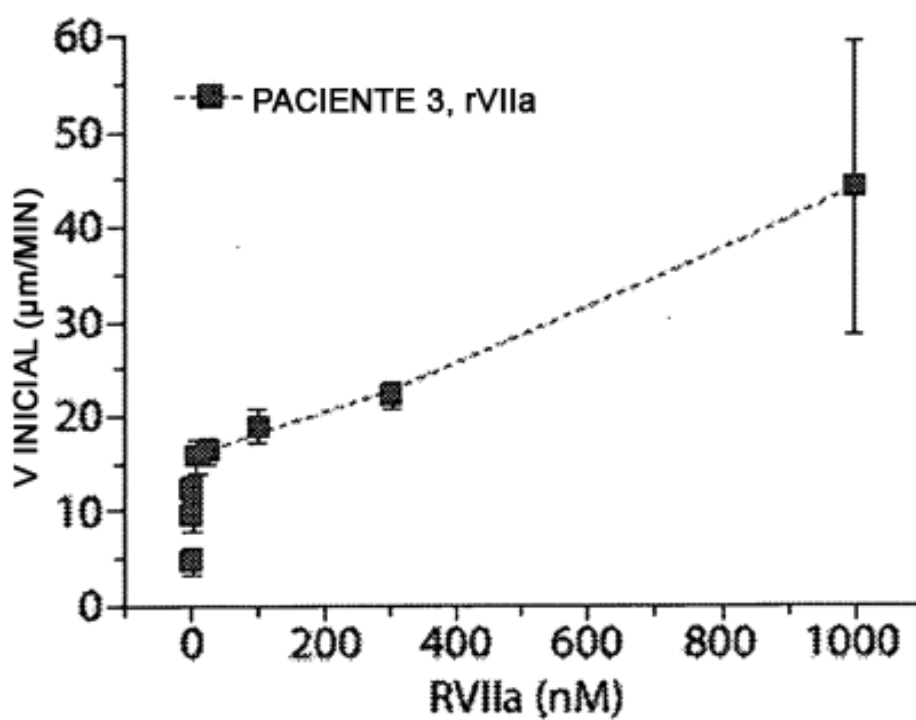


Fig. 68D

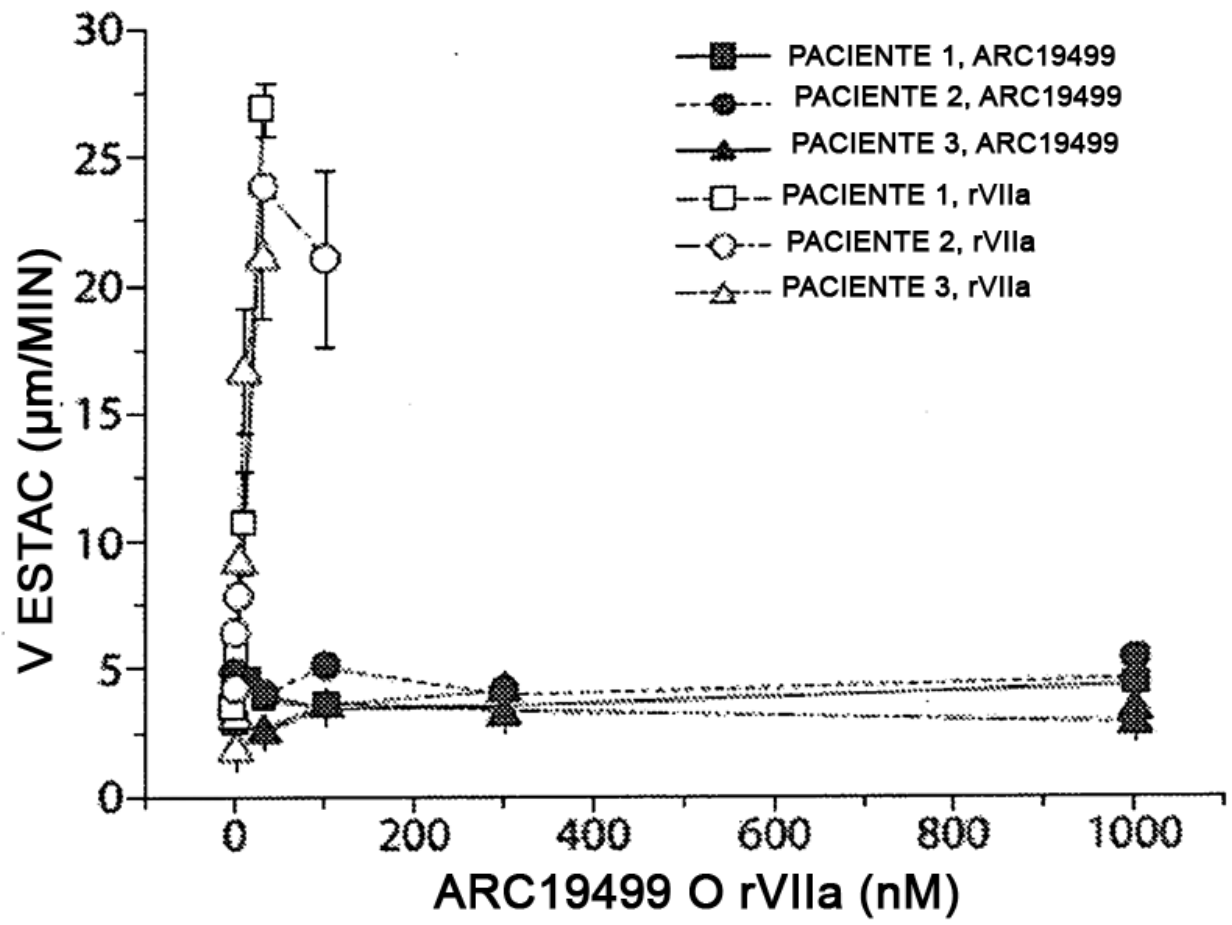


Fig. 69

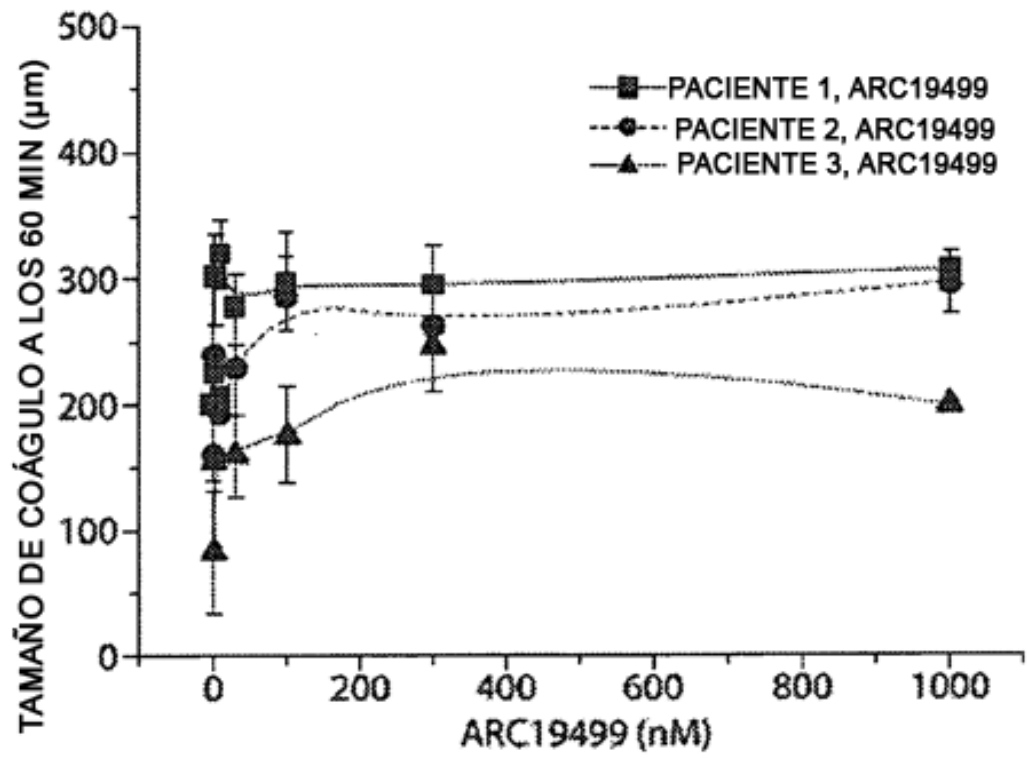


Fig. 70A

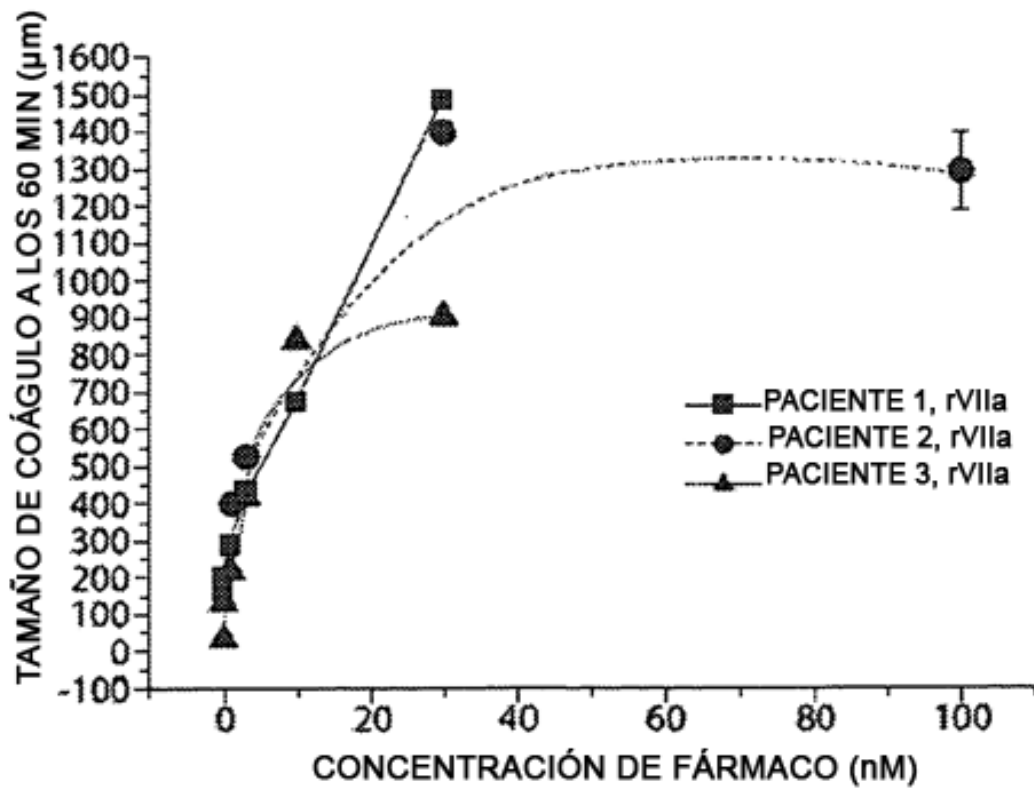


Fig. 70B

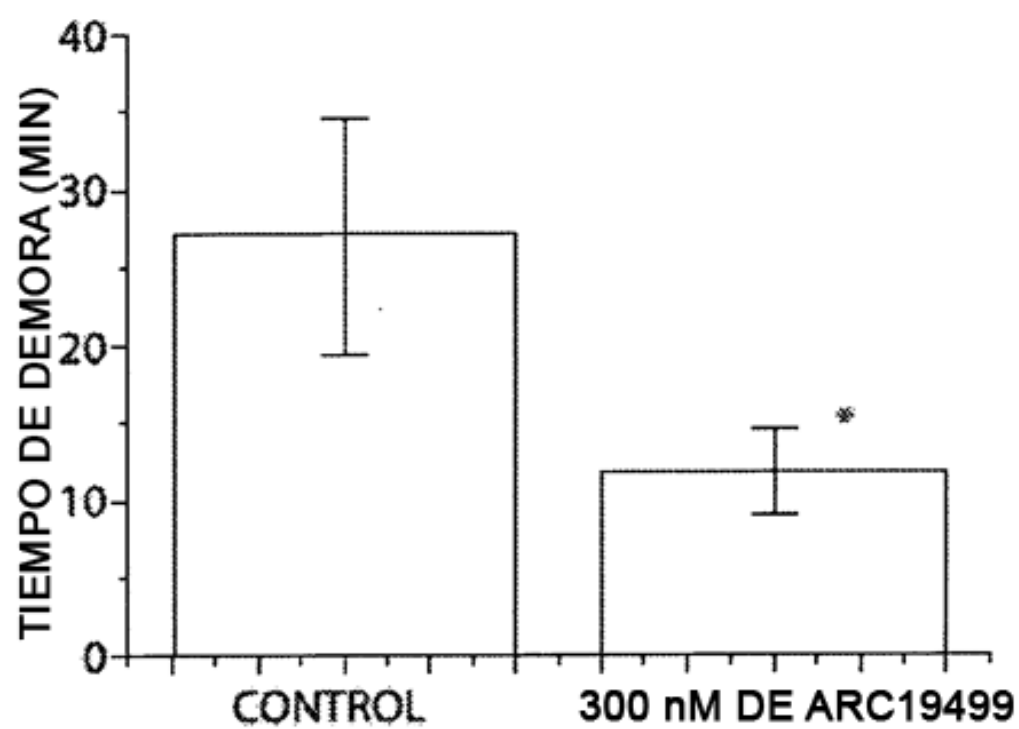


Fig. 71A

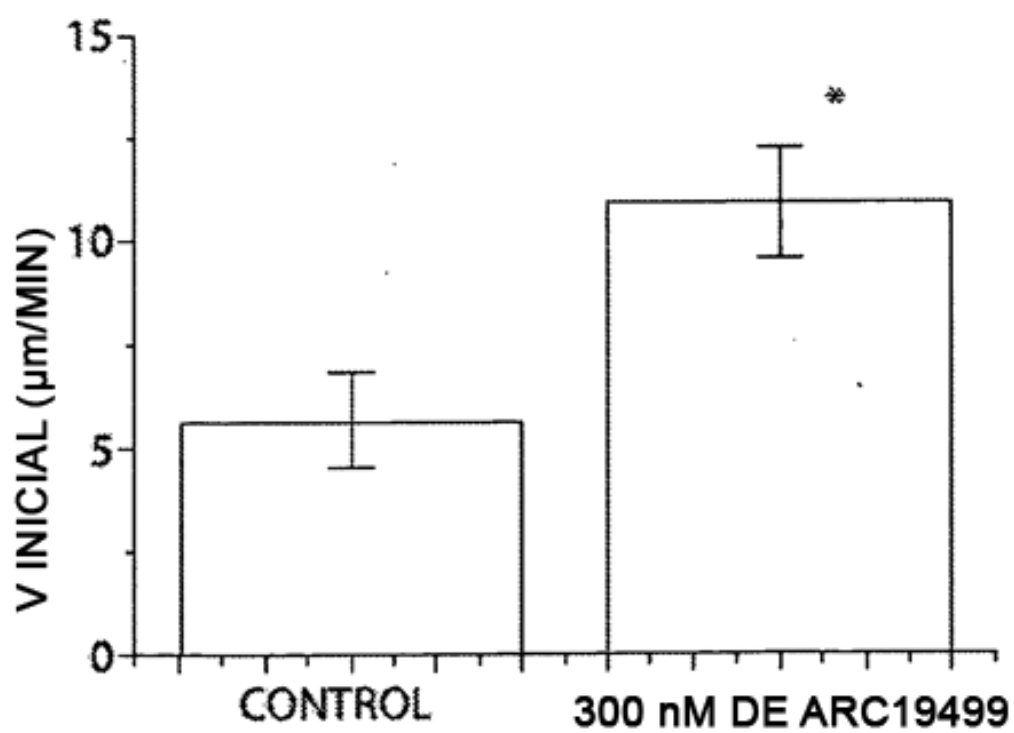


Fig. 71B

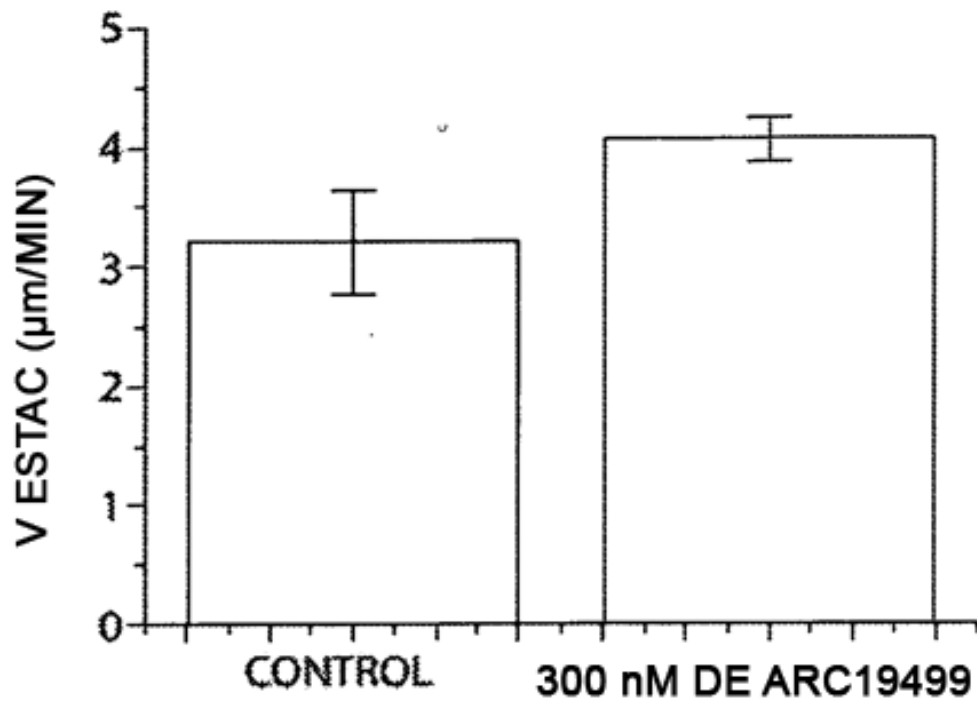


Fig. 71C

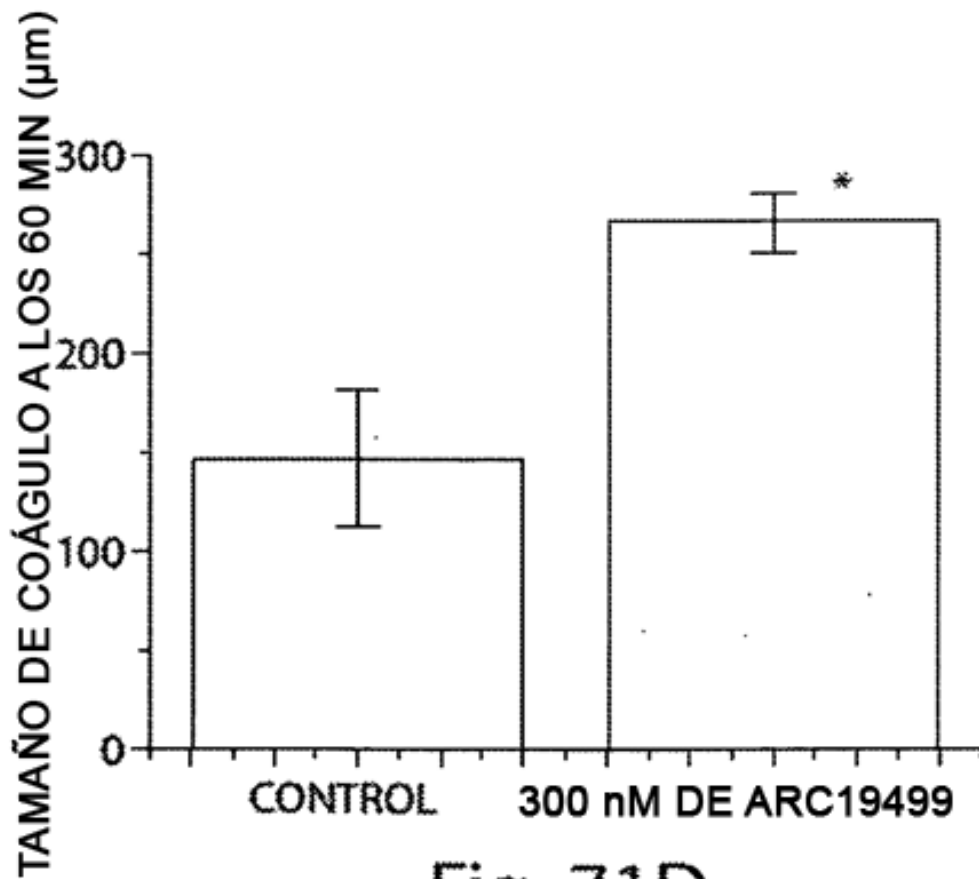


Fig. 71D

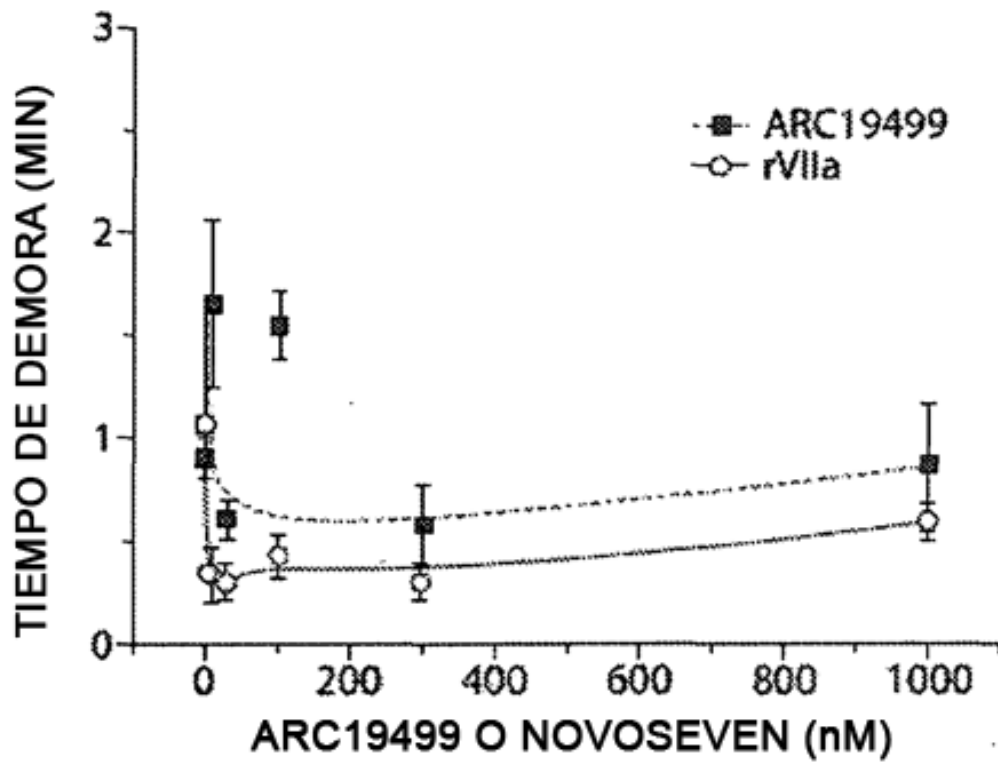


Fig. 72A

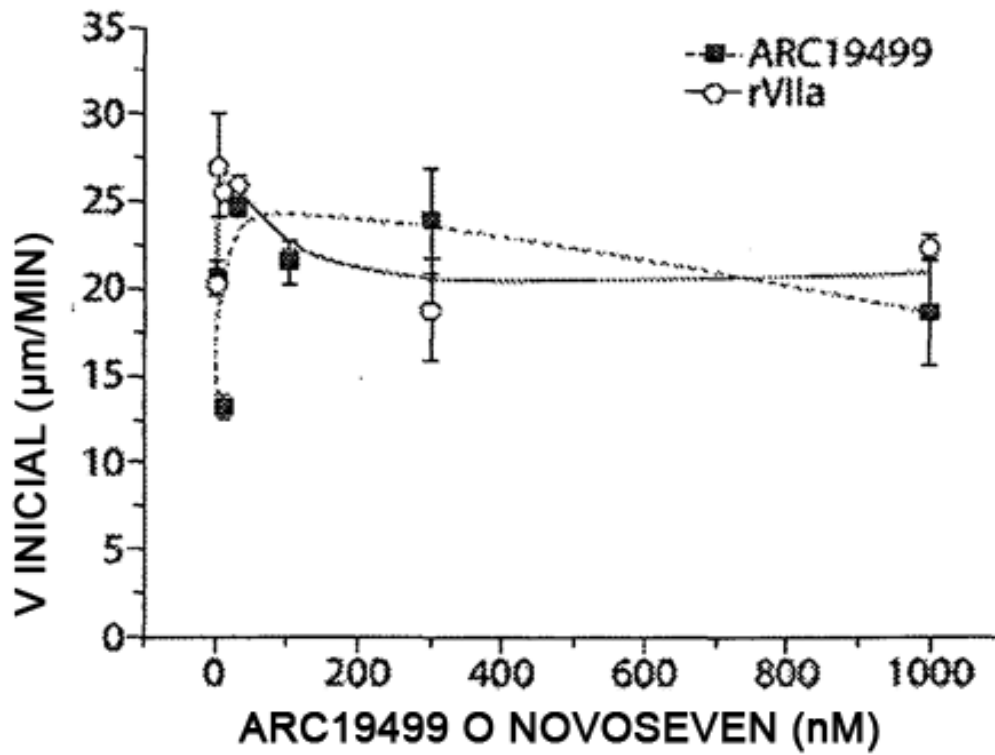


Fig. 72B

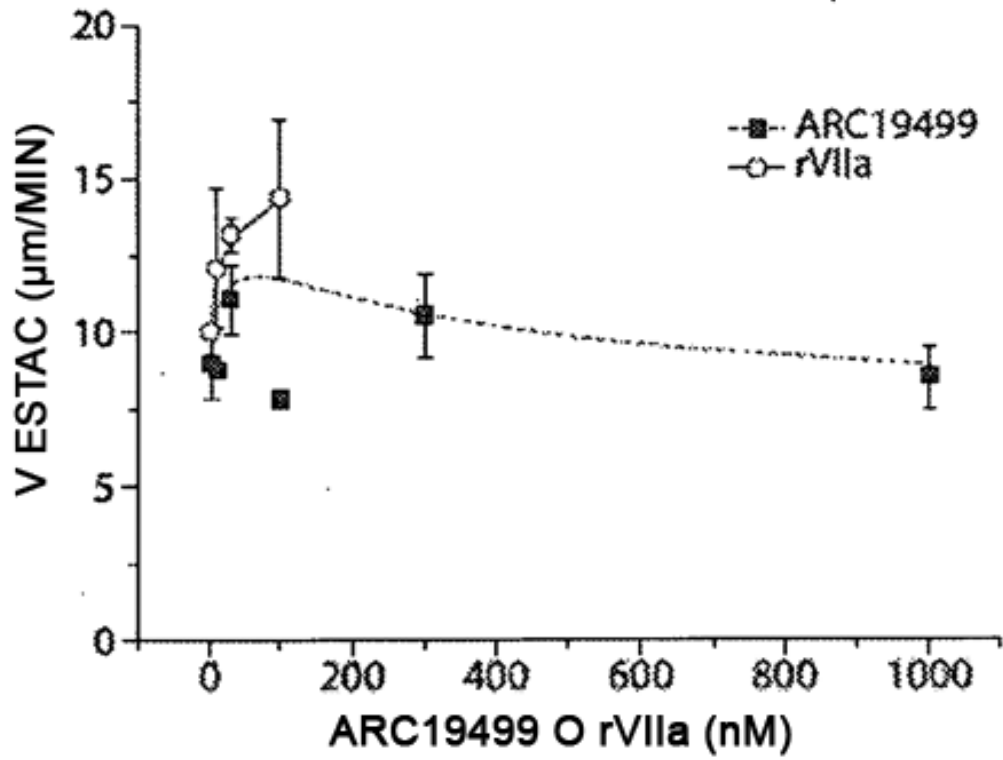


Fig. 72C

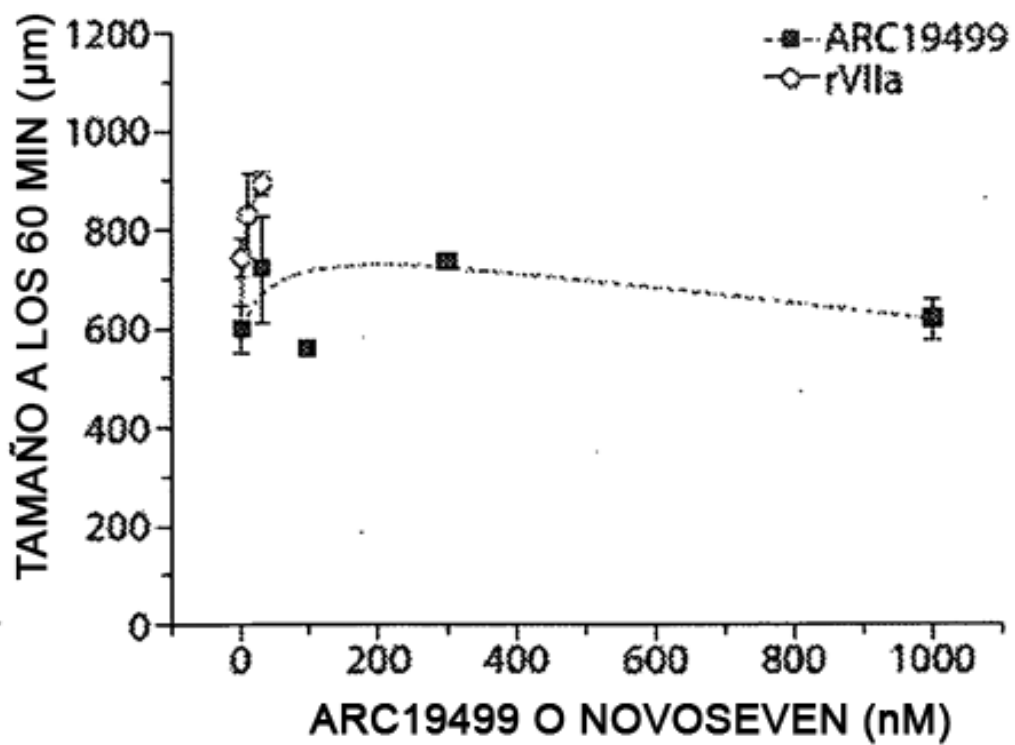


Fig. 72D

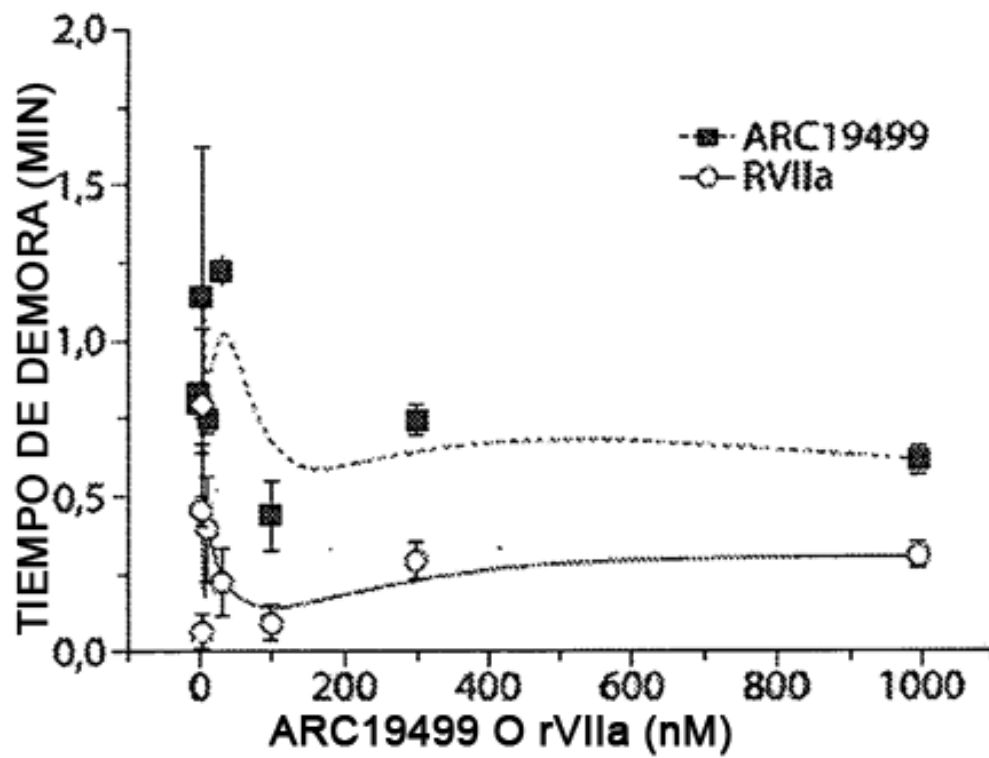


Fig. 73A

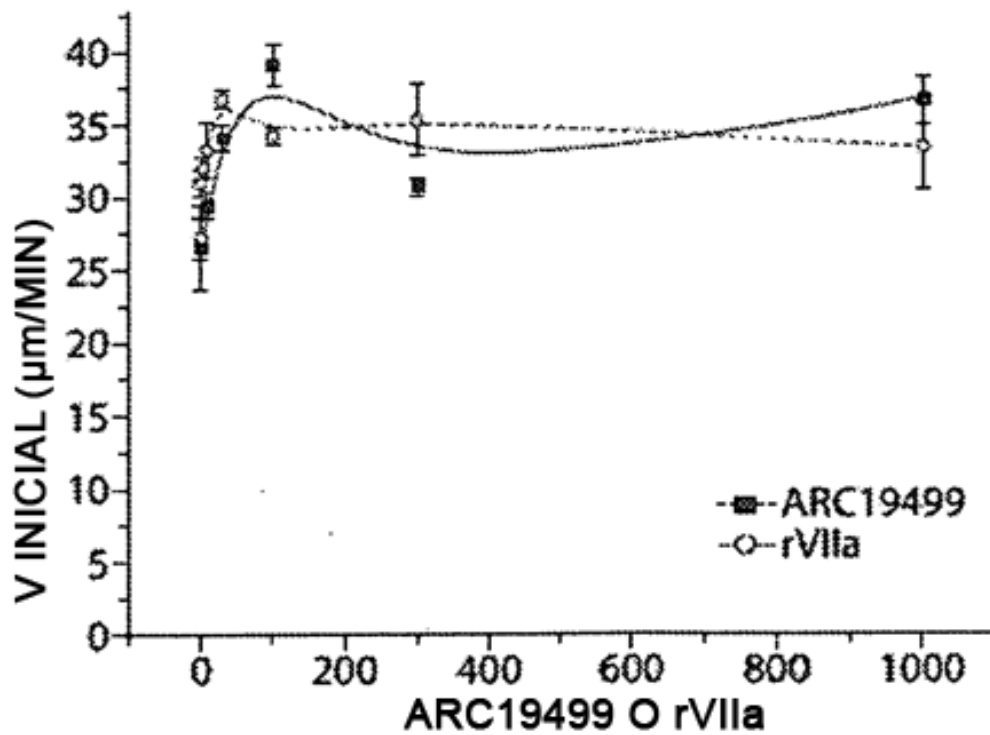


Fig. 73B

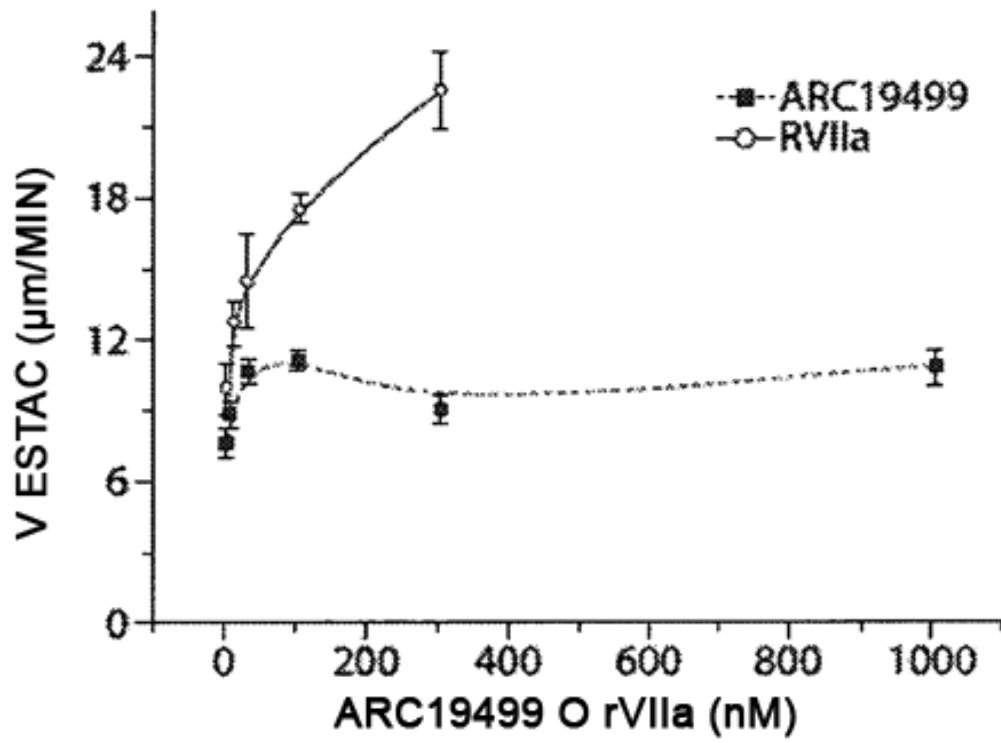


Fig. 73C

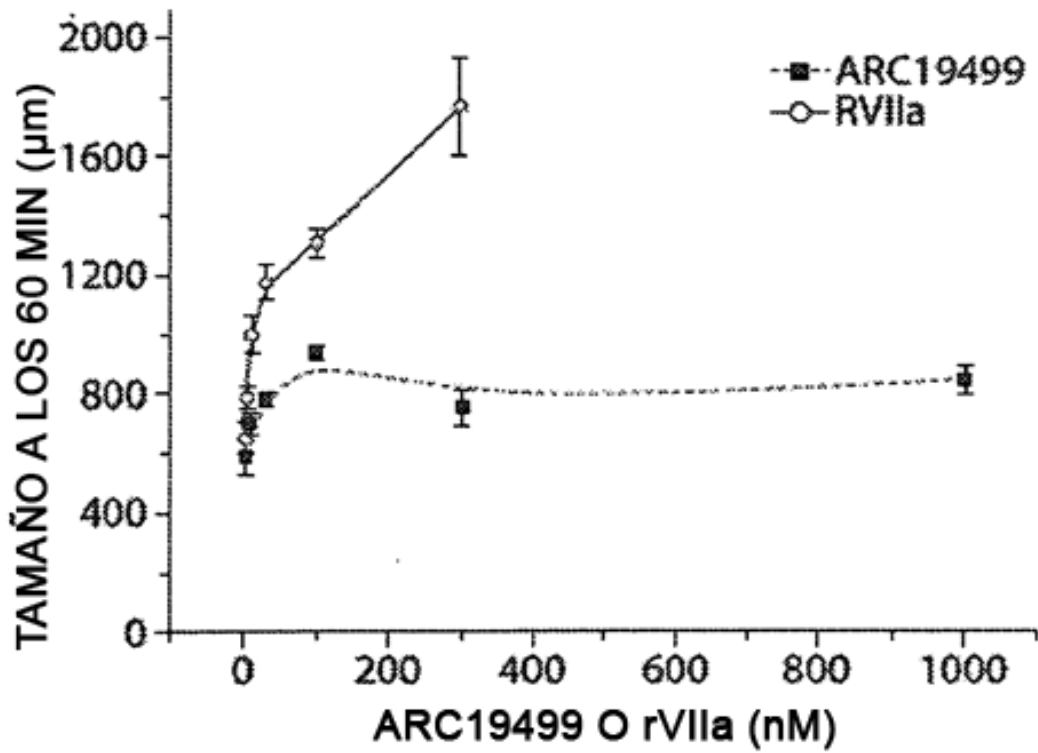


Fig. 73D

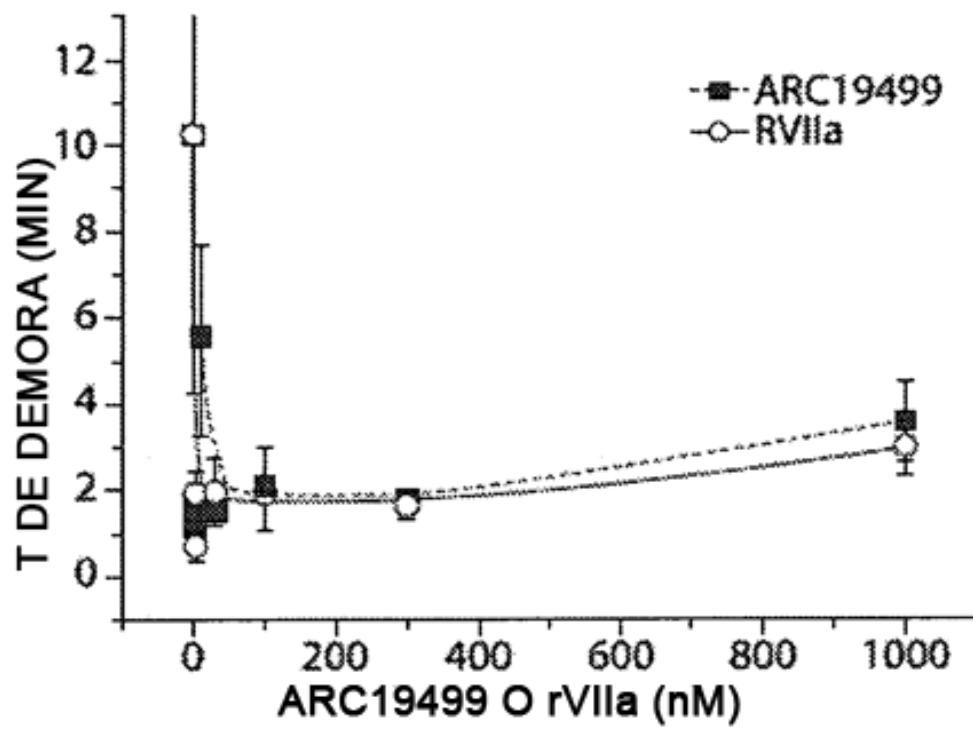


Fig. 74A

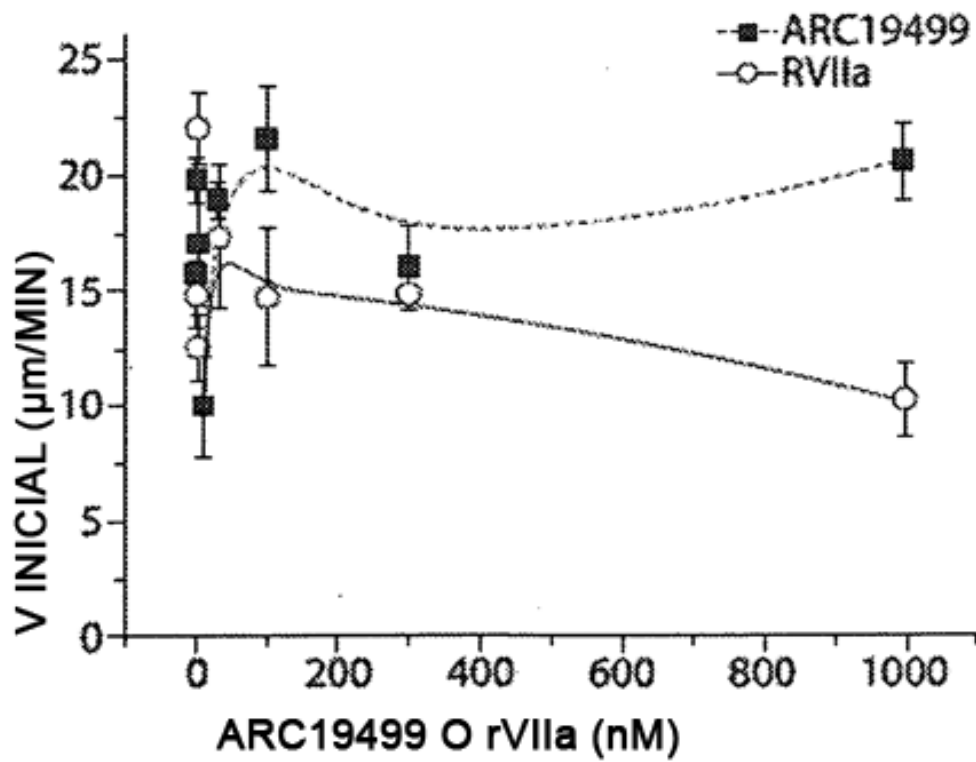


Fig. 74B

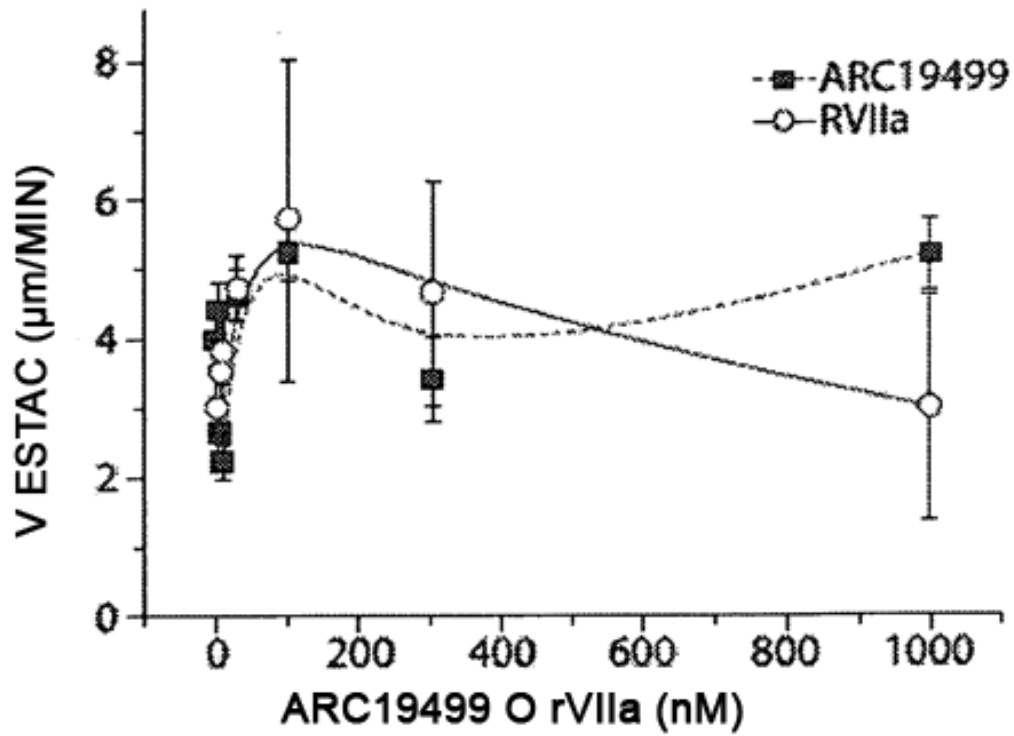


Fig. 74C

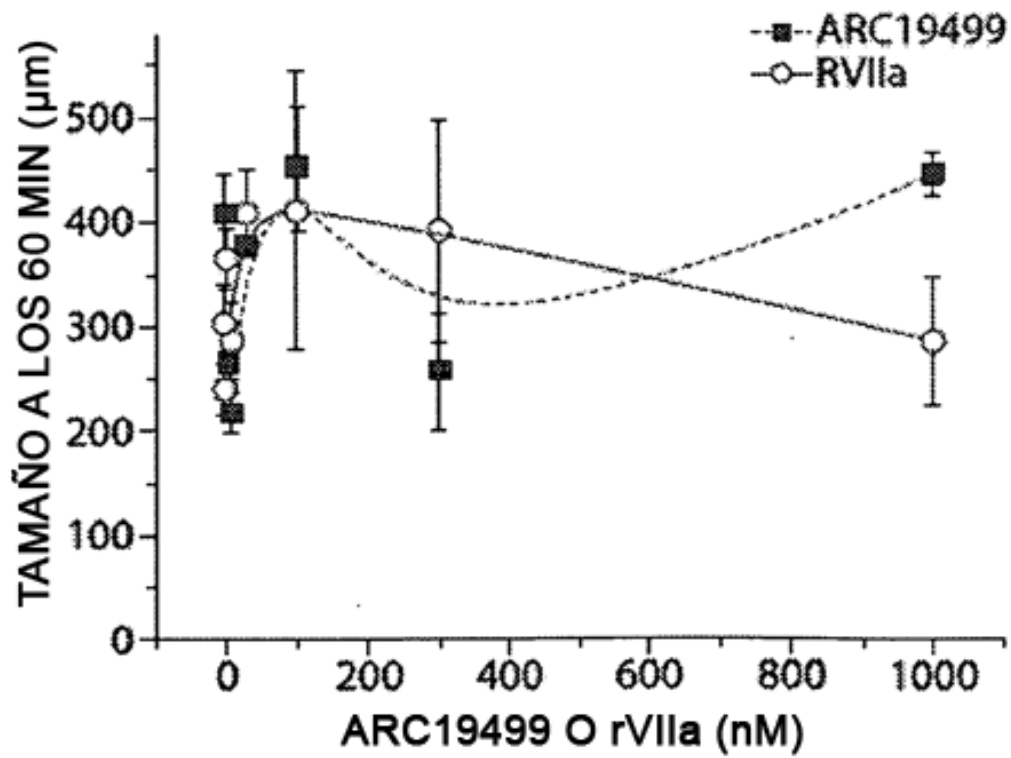


Fig. 74D

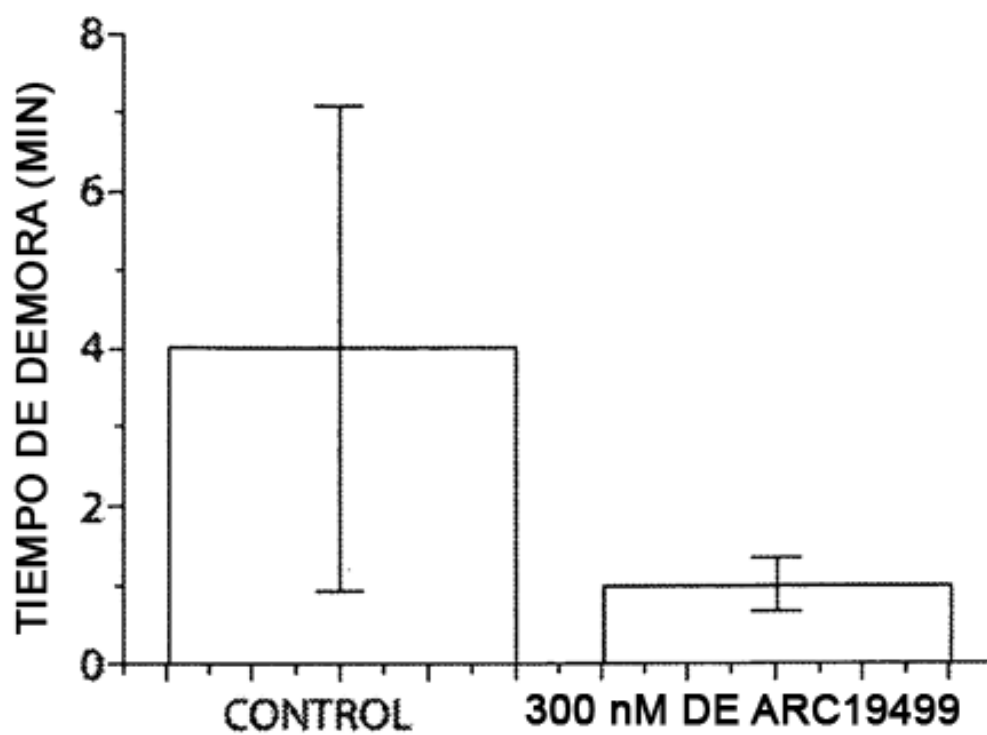


Fig. 75A

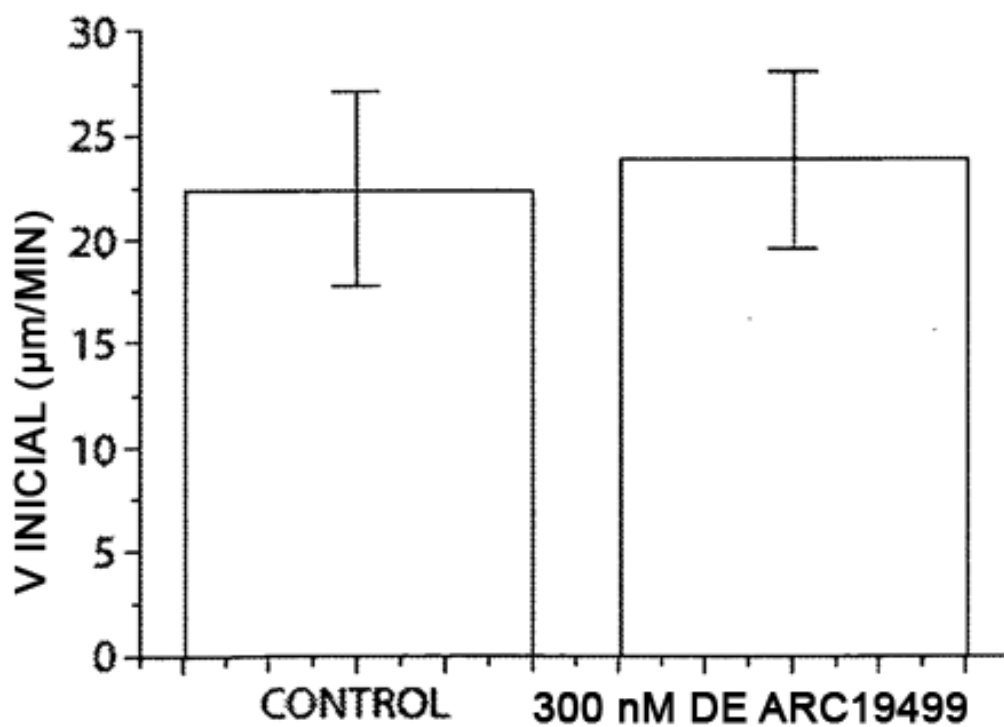


Fig. 75B

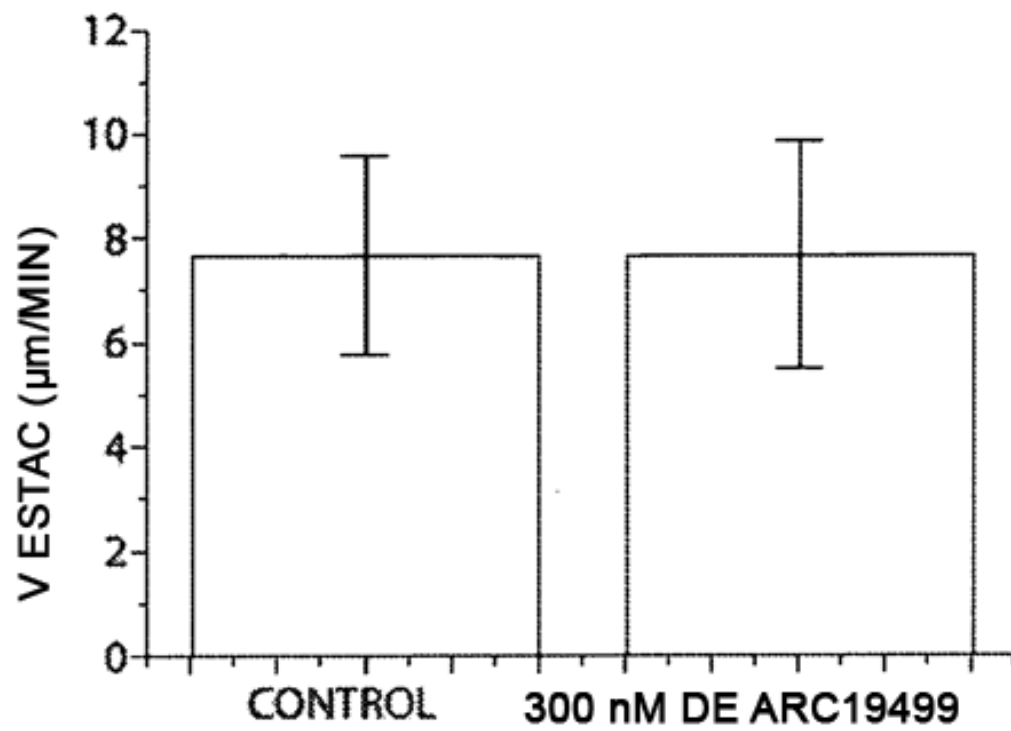


Fig. 75C

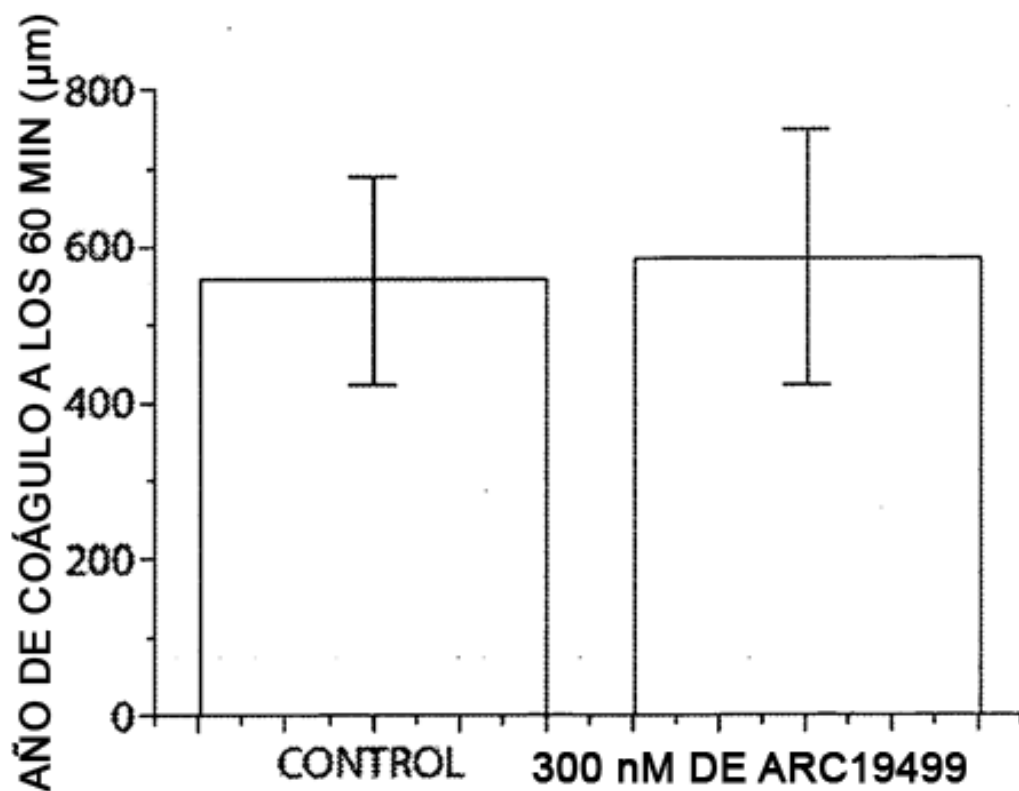


Fig. 75D

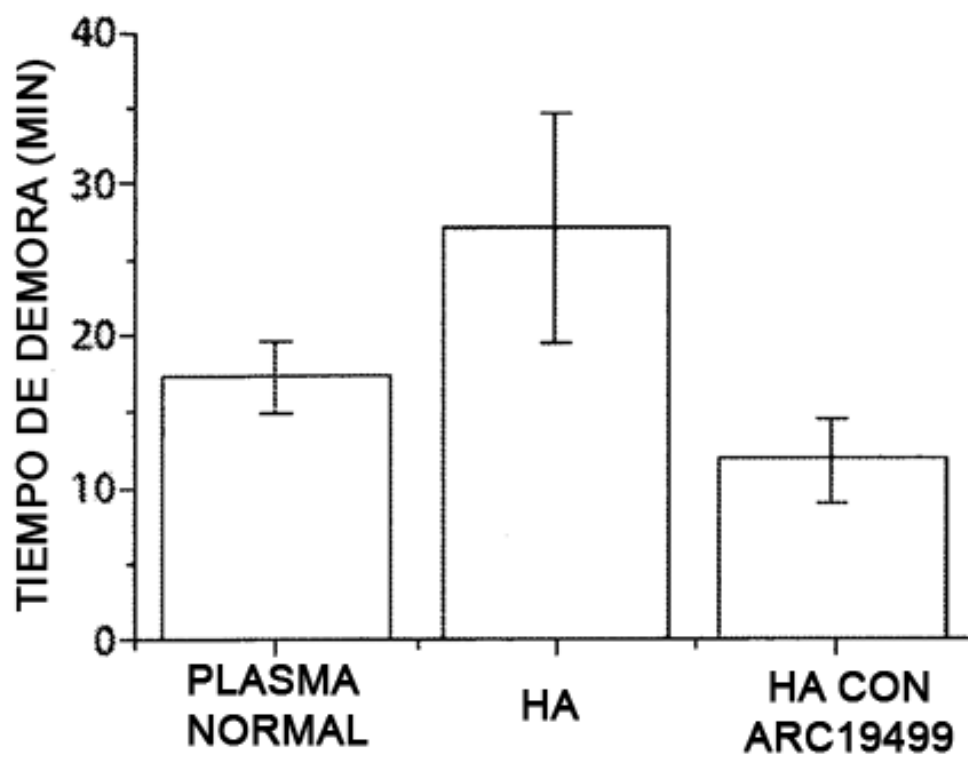


Fig. 76A

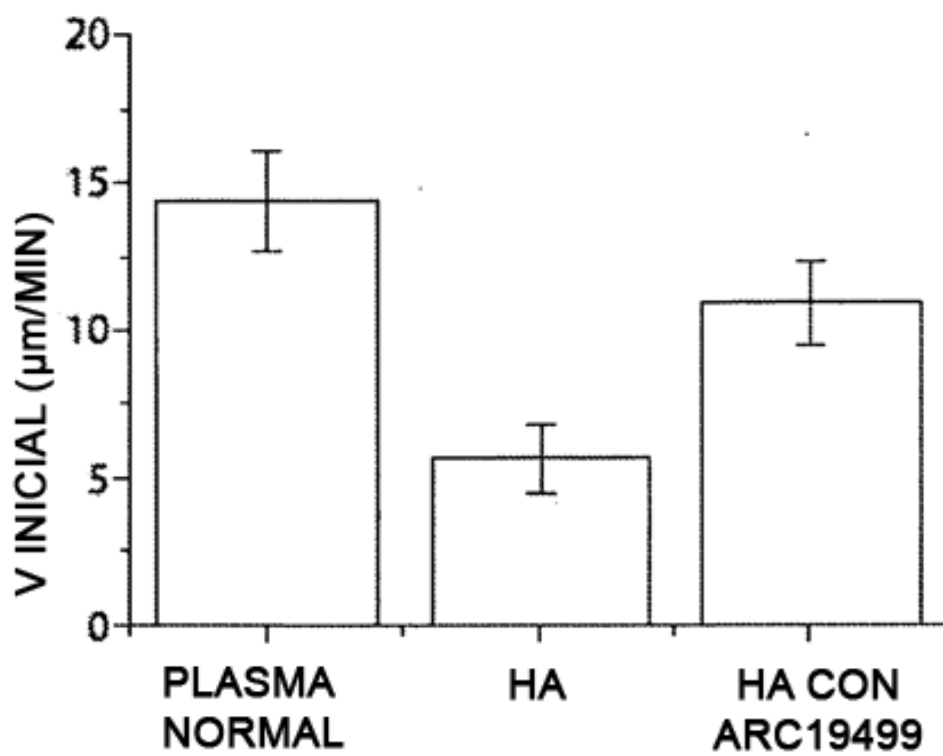


Fig. 76B

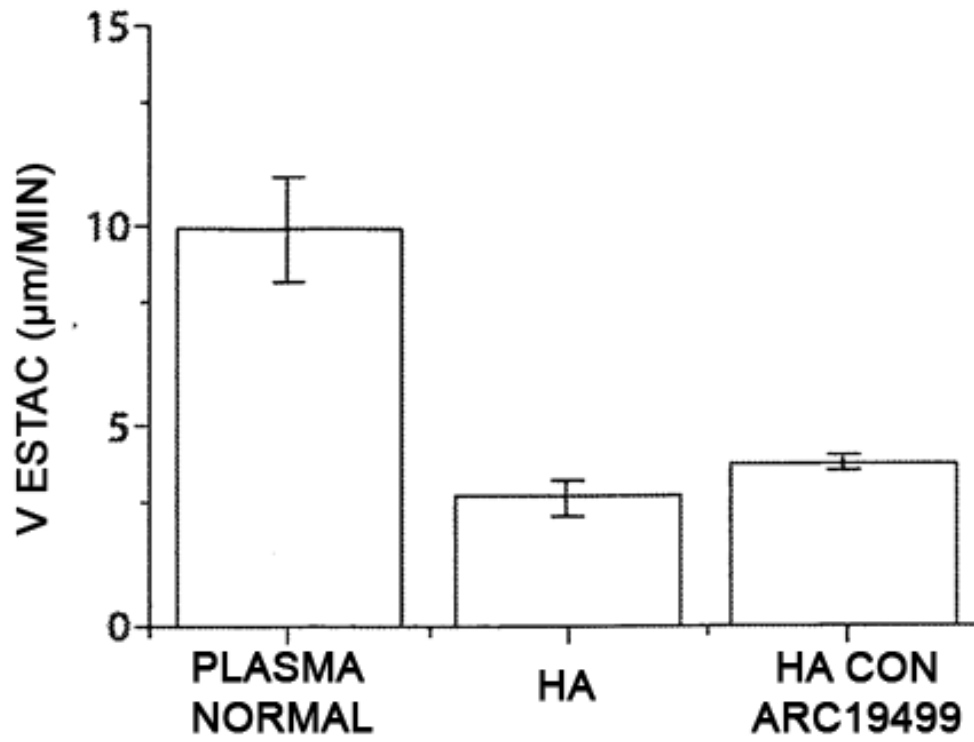


Fig. 76C

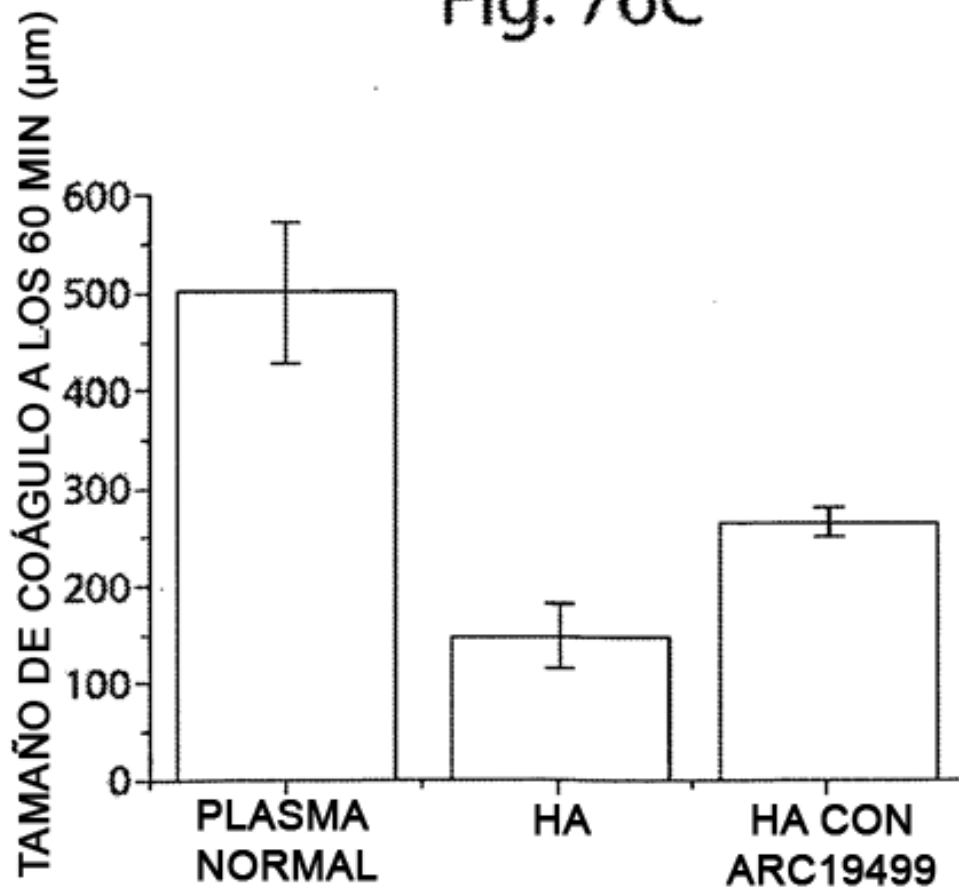


Fig. 76D

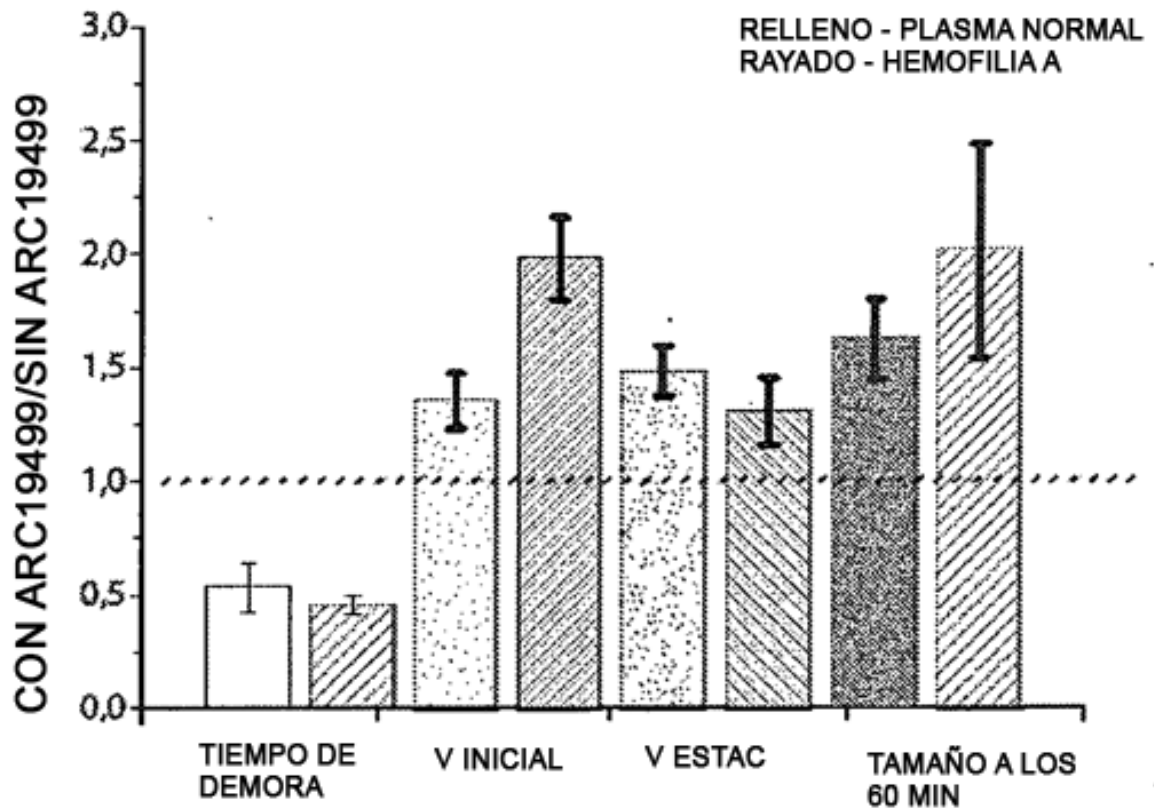
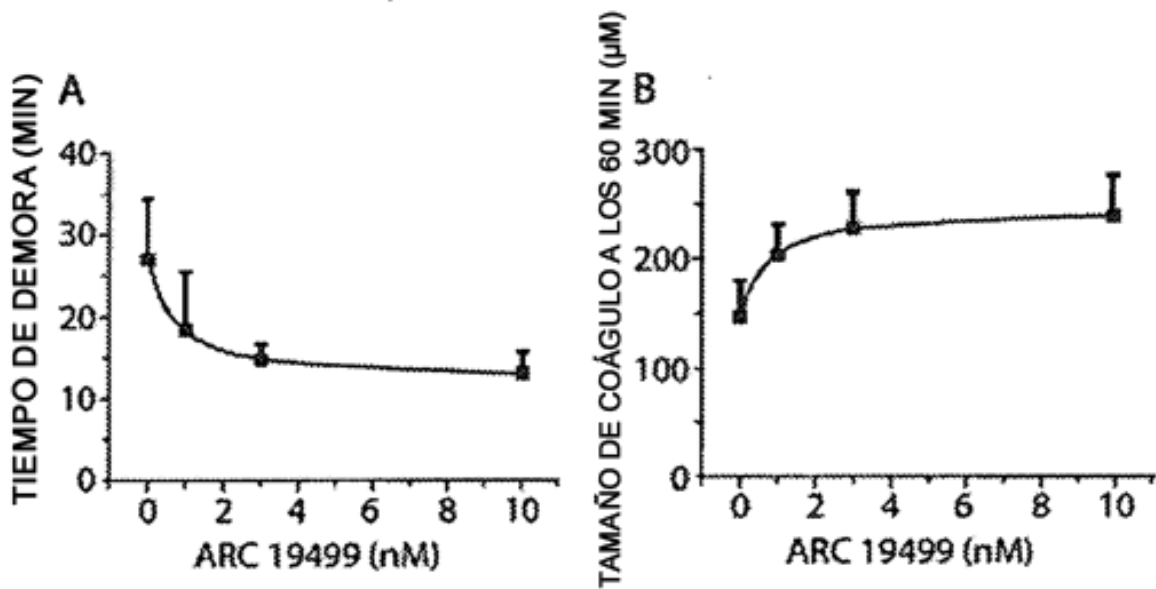


Fig. 77



PARÁMETRO	Cl ₅₀ (nM)	E.E (nM)
TIEMPO DE DEMORA	0,7	0,04
TAMAÑO	0,7	0,06

Fig. 78

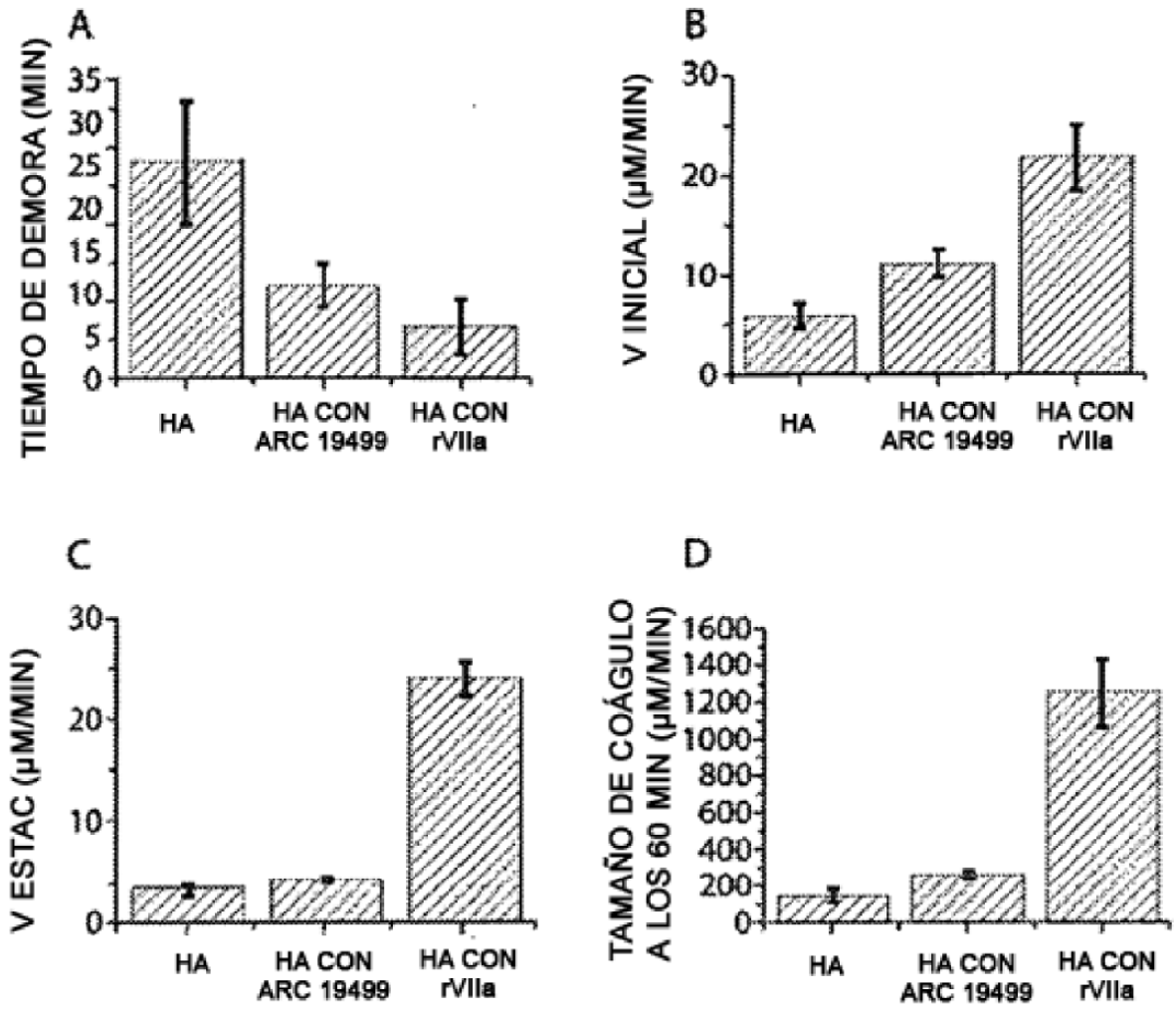


Fig. 79

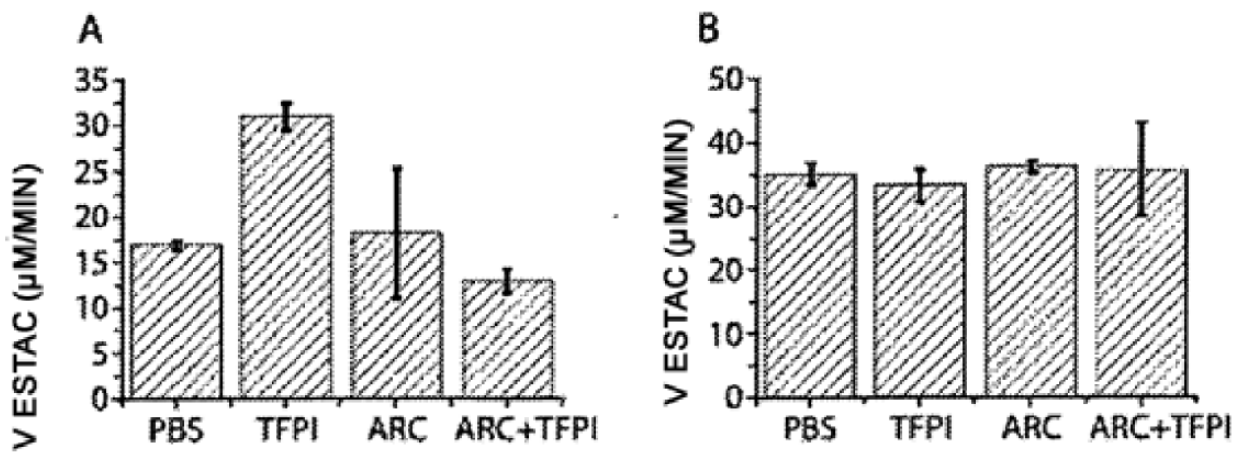


Fig. 80

TF-ACT EN SANGRE COMPLETA DE SUJETOS NORMALES			
[ARC19499] (nM)	n.º 2 (N) (SEGUNDOS)	n.º 6 (N) (SEGUNDOS)	n.º 7 (N) (SEGUNDOS)
700		311	
350	317	287	277
175	278	295	293
88	319	305	258
44			267
0	353	342	311

TF-ACT EN SANGRE COMPLETA DE SUJETOS CON HEMOFILIA B		
[ARC19499] (nM)	n.º 4 (B) (SEGUNDOS)	n.º 9 (B) (SEGUNDOS)
350	438	522
175	435	457/510
88	323	420
44	460	510
0	528	580

TF-ACT EN SANGRE COMPLETA DE SUJETOS CON HEMOFILIA A							
[ARC19499] (nM)	n.º 1 (A) (SEGUNDOS)	n.º 3 (A) (SEGUNDOS)	n.º 5 (A) (SEGUNDOS)	n.º 8 (A) (SEGUNDOS)	n.º 10 (A) (SEGUNDOS)	n.º 11 (A) (SEGUNDOS)	n.º 12 (A) (SEGUNDOS)
3115	264						
1558	313						
1400						455	299
800	256						
700		551/500	489		416	634	281
350		444	434	483	418	347	295
175		457	392	453	456	491	291
88			468	464		456	306
44					477		
0	578	651	540	642	527	783	328

Fig. 81

PT CON DILUCIÓN EN PLASMA DE SUJETOS NORMALES			
[ARC19499] (nM)	n.º 2 (N) (SEGUNDOS)	n.º 6 (N) (SEGUNDOS)	n.º 7 (N) (SEGUNDOS)
500	179	185	174
125	183	225	168
32	181	242	170
8	191	246	176
2	294	274	265
0	>360	>360	>360

PT CON DILUCIÓN EN PLASMA DE SUJETOS CON HEMOFILIA B		
[ARC19499] (nM)	n.º 4 (B) (SEGUNDOS)	n.º 9 (B) (SEGUNDOS)
500	215	185
125	227	189
32	225	192
8	241	210
2	>360	>360
0	>360	>360

PT CON DILUCIÓN EN PLASMA DE SUJETOS CON HEMOFILIA A							
[ARC19499] (nM)	n.º 1 (A) (SEGUNDOS)	n.º 3 (A) (SEGUNDOS)	n.º 5 (A) (SEGUNDOS)	n.º 8 (A) (SEGUNDOS)	n.º 10 (A) (SEGUNDOS)	n.º 11 (A) (SEGUNDOS)	n.º 12 (A) (SEGUNDOS)
500	163	162	162	156	154	162	>360
125	167	164	163	157	156	168	>360
32	171	168	164	163	157	171	>360
8	185	193	175	192	163	195	>360
2	>360	>360	>360	>360	169	>360	>360
0	>360	>360	>360	>360	169	>360	>360

Fig. 82

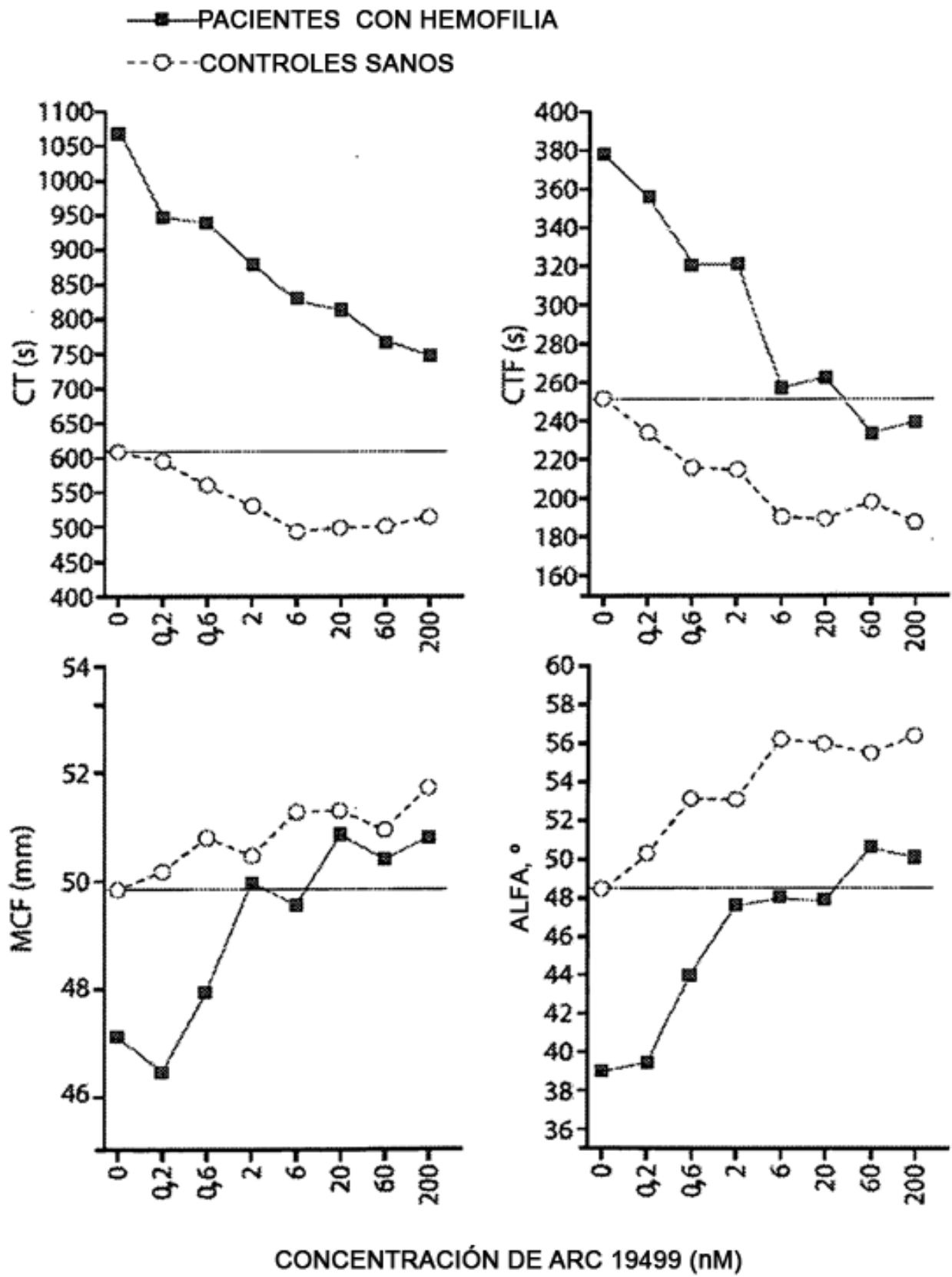


Fig. 83

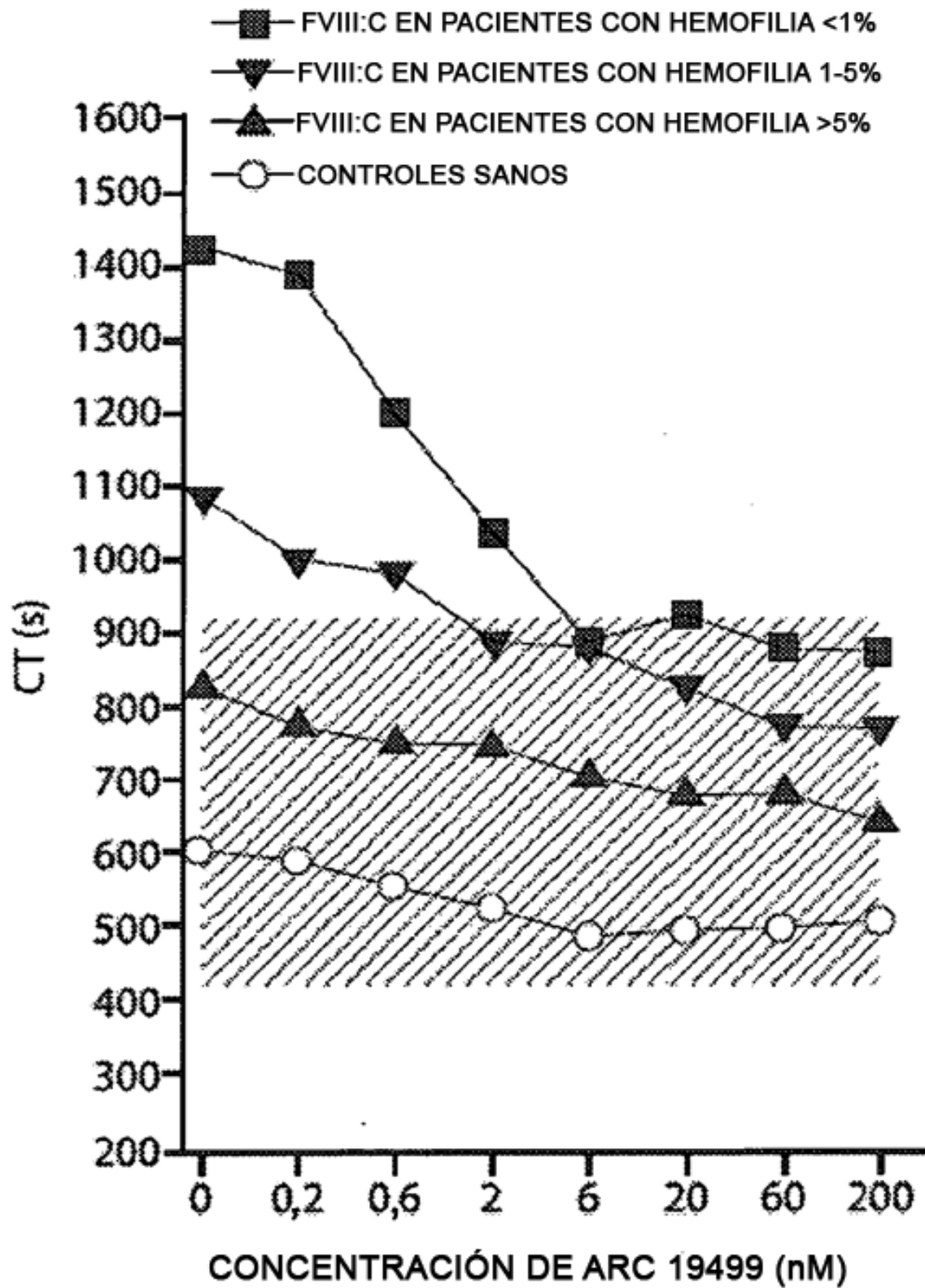


Fig. 84

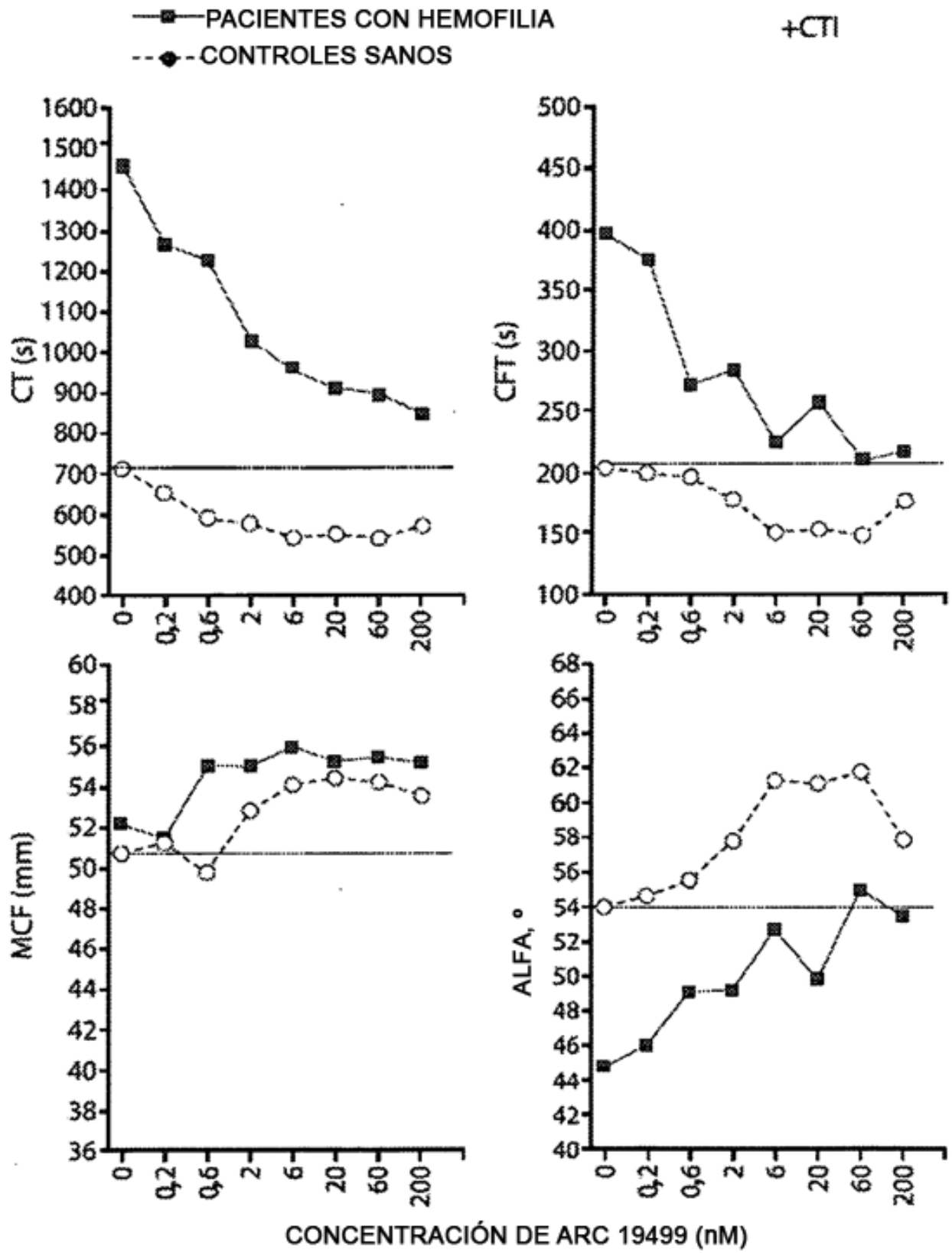


Fig. 85

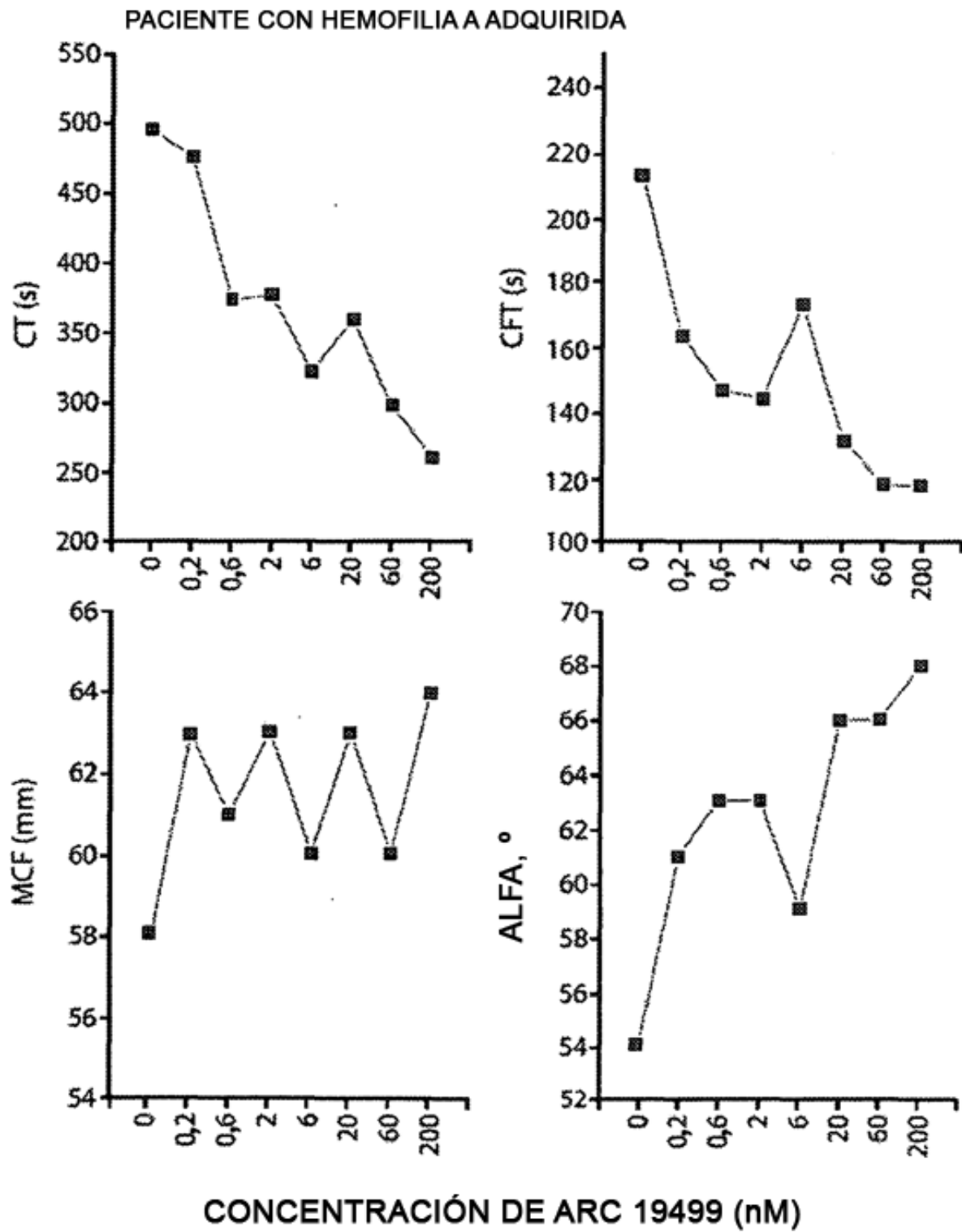


Fig. 86

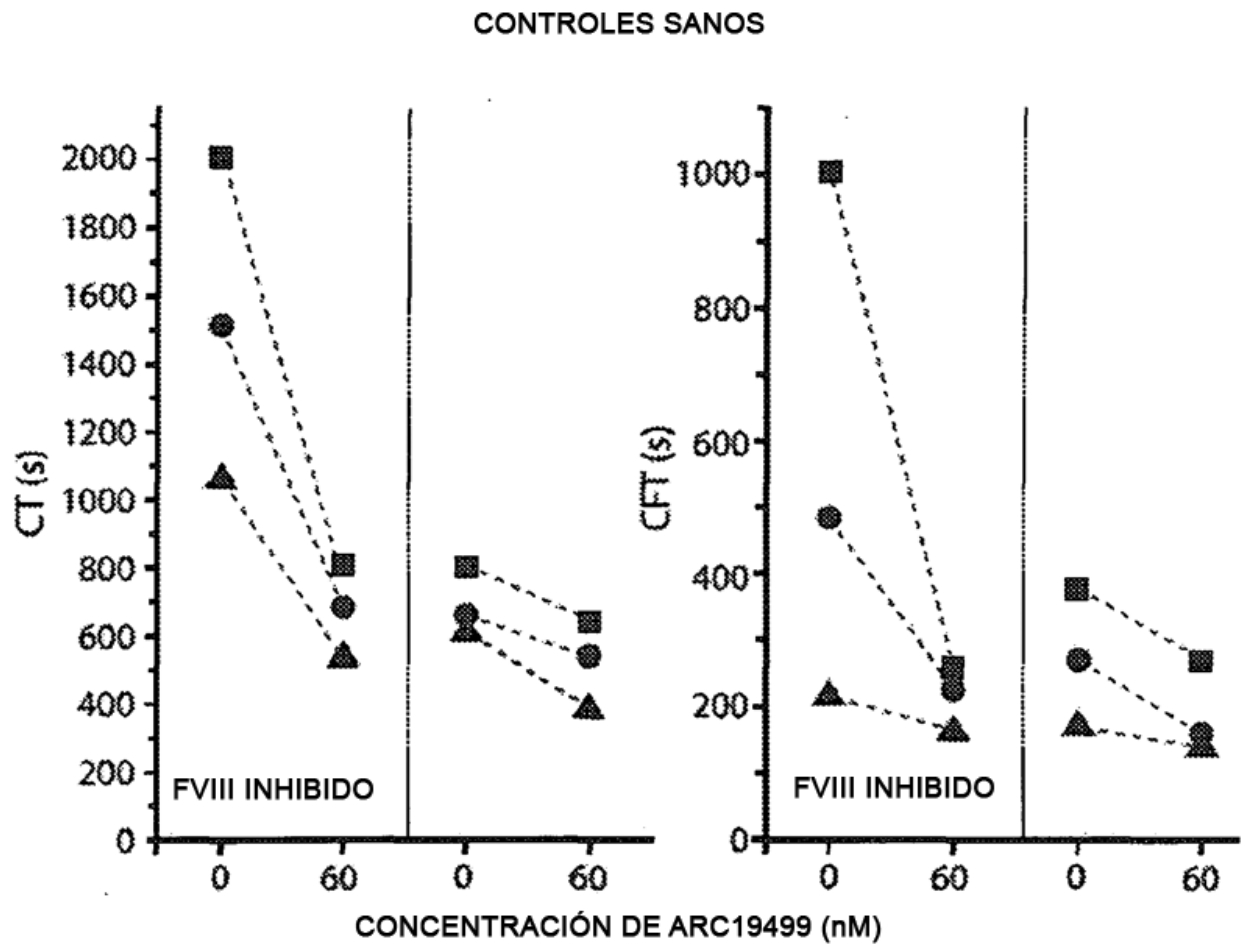


Fig. 87

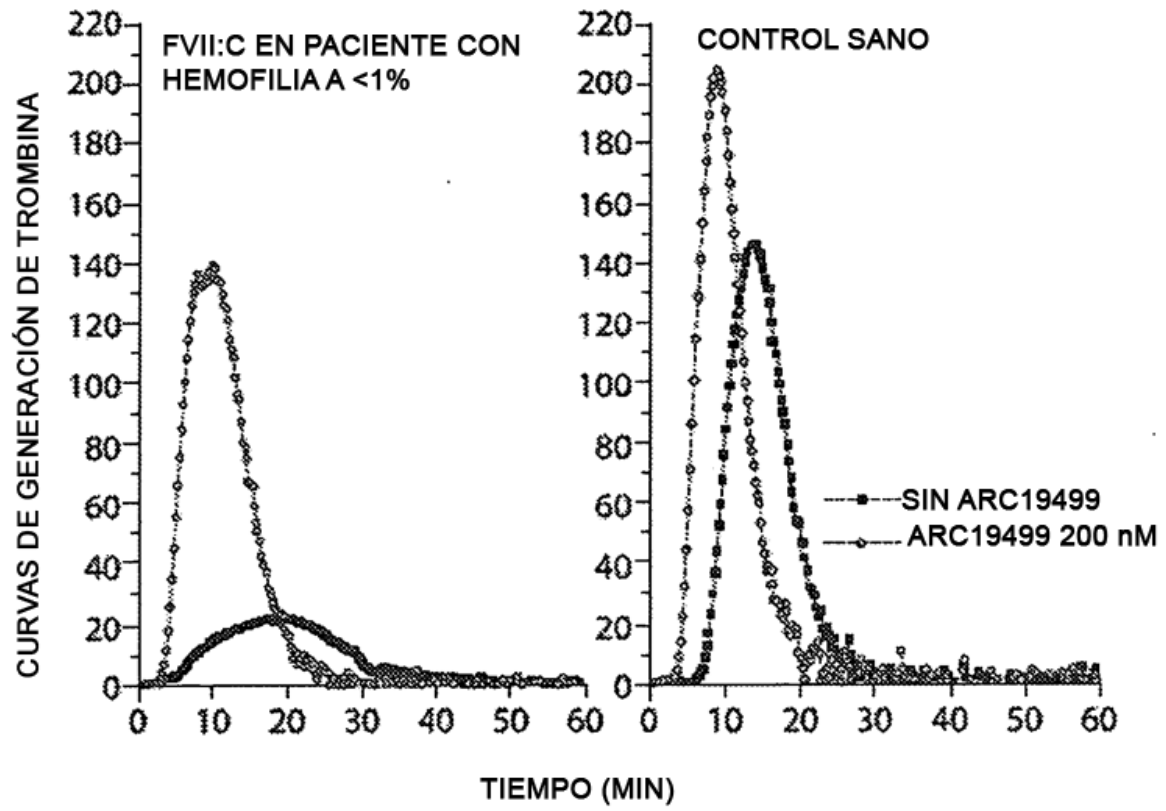


Fig. 88

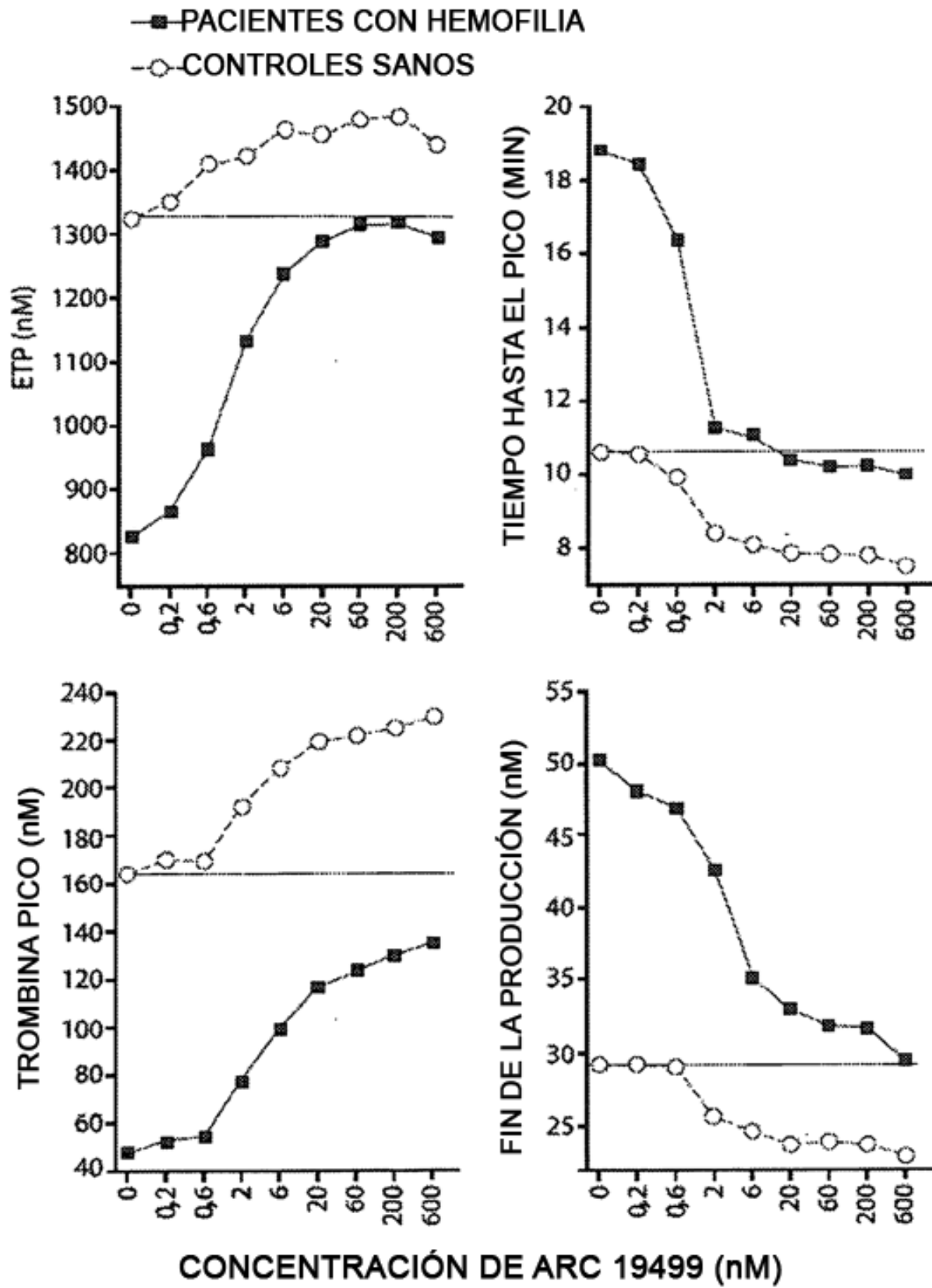


Fig. 89

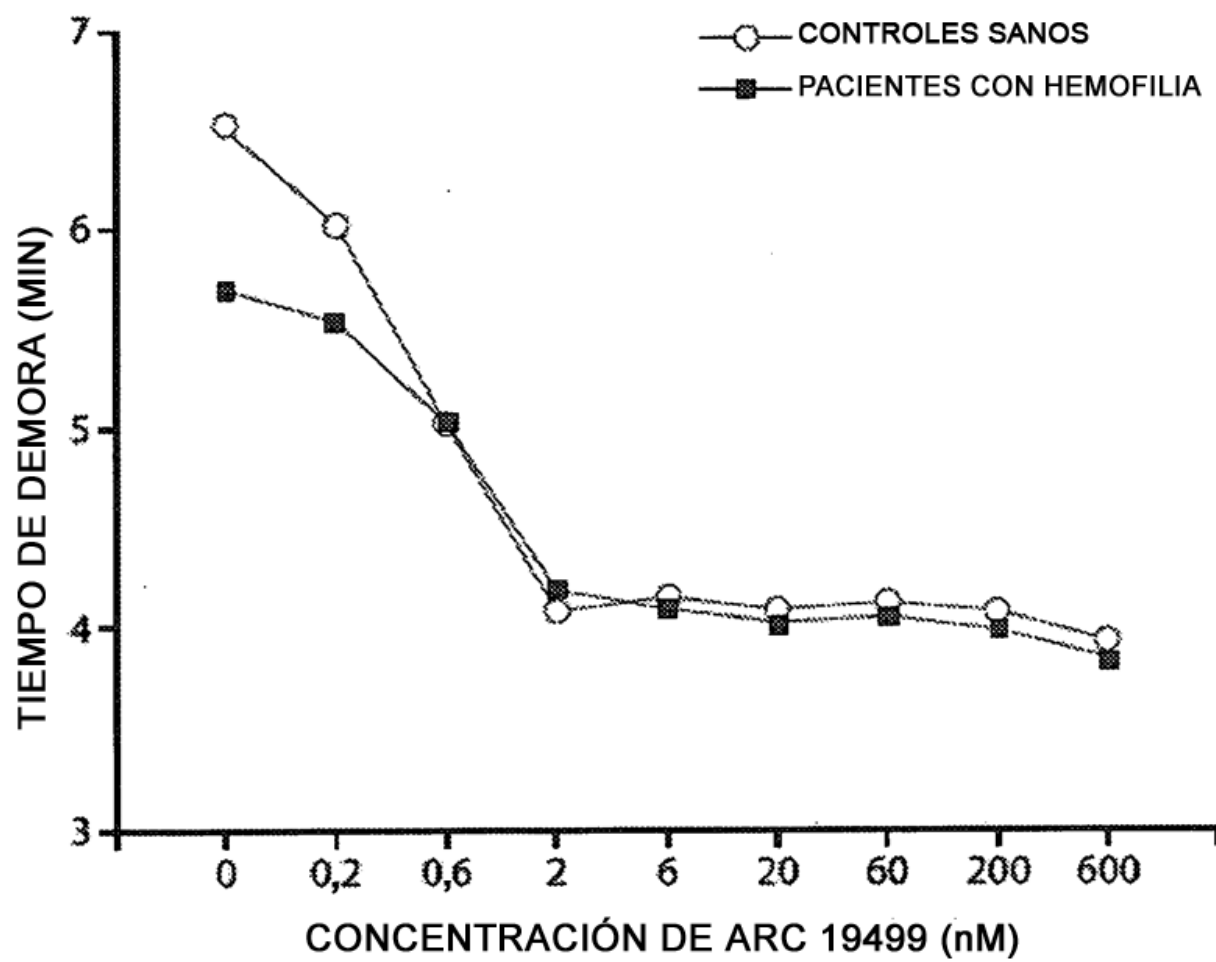


Fig. 90

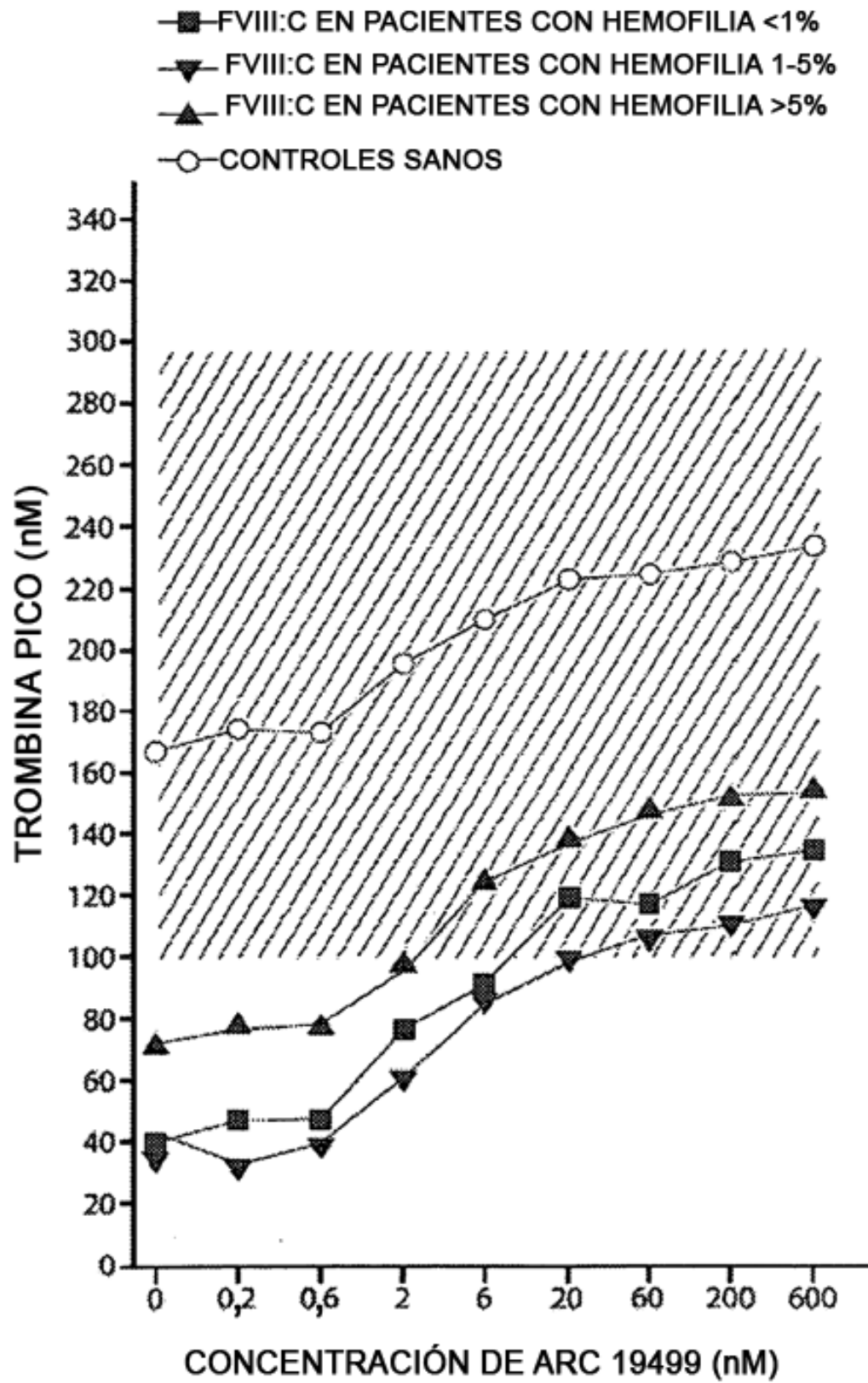


Fig. 91

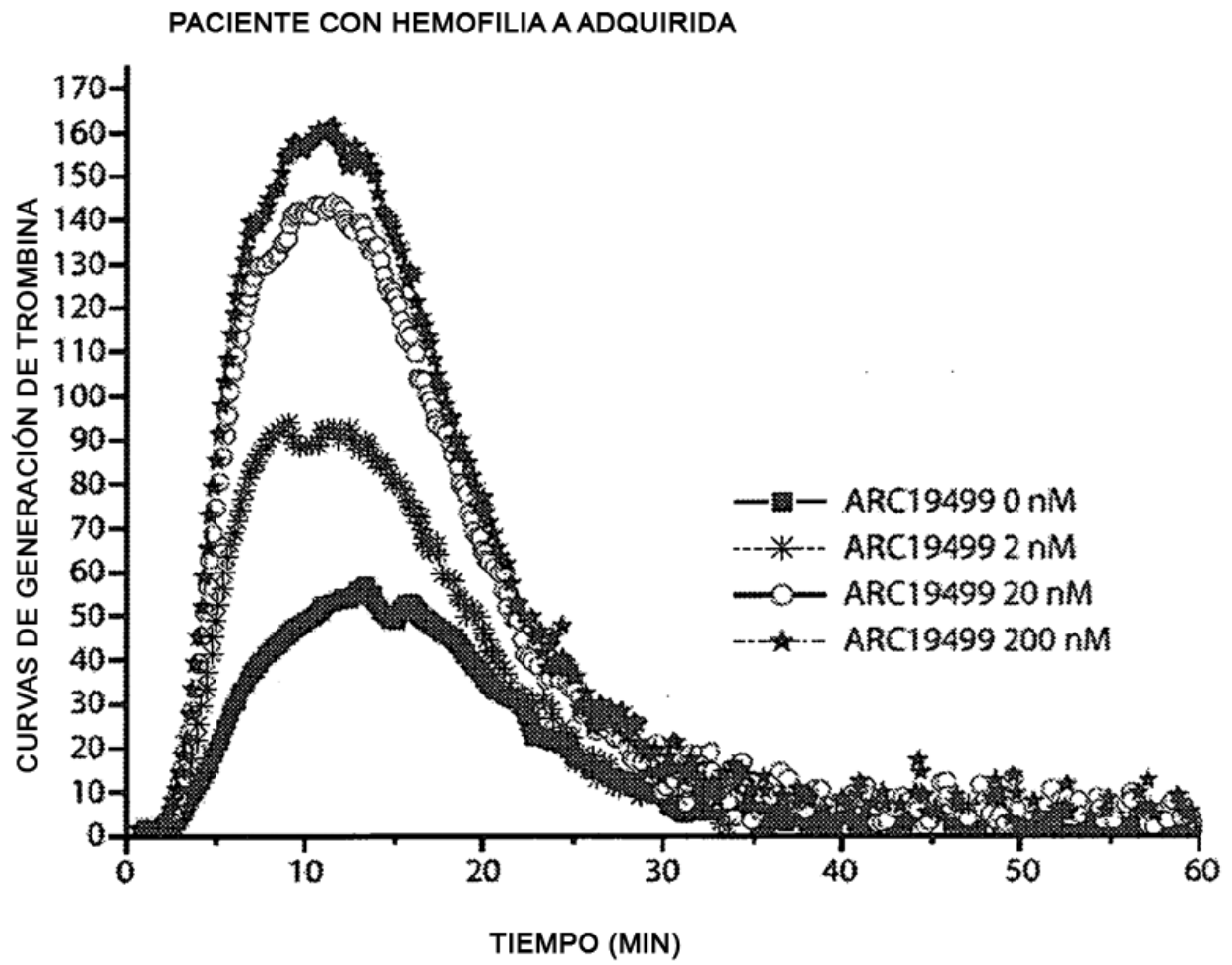


Fig. 92

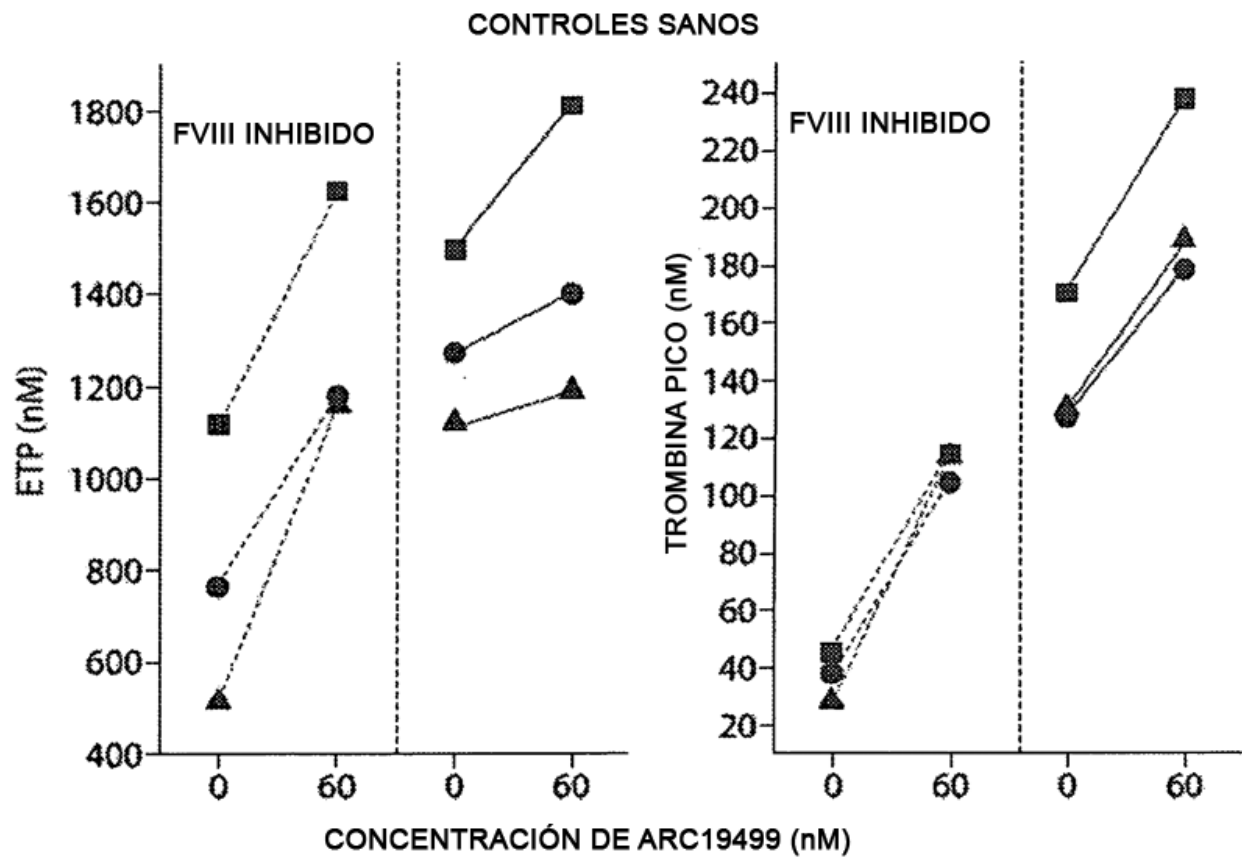
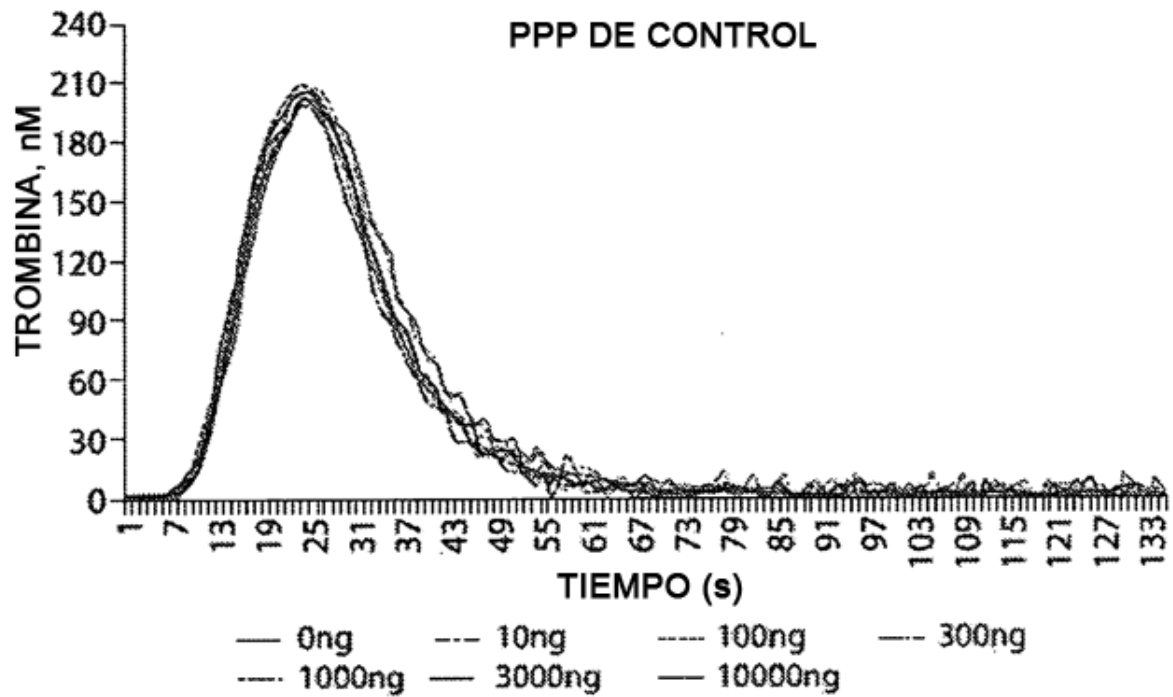
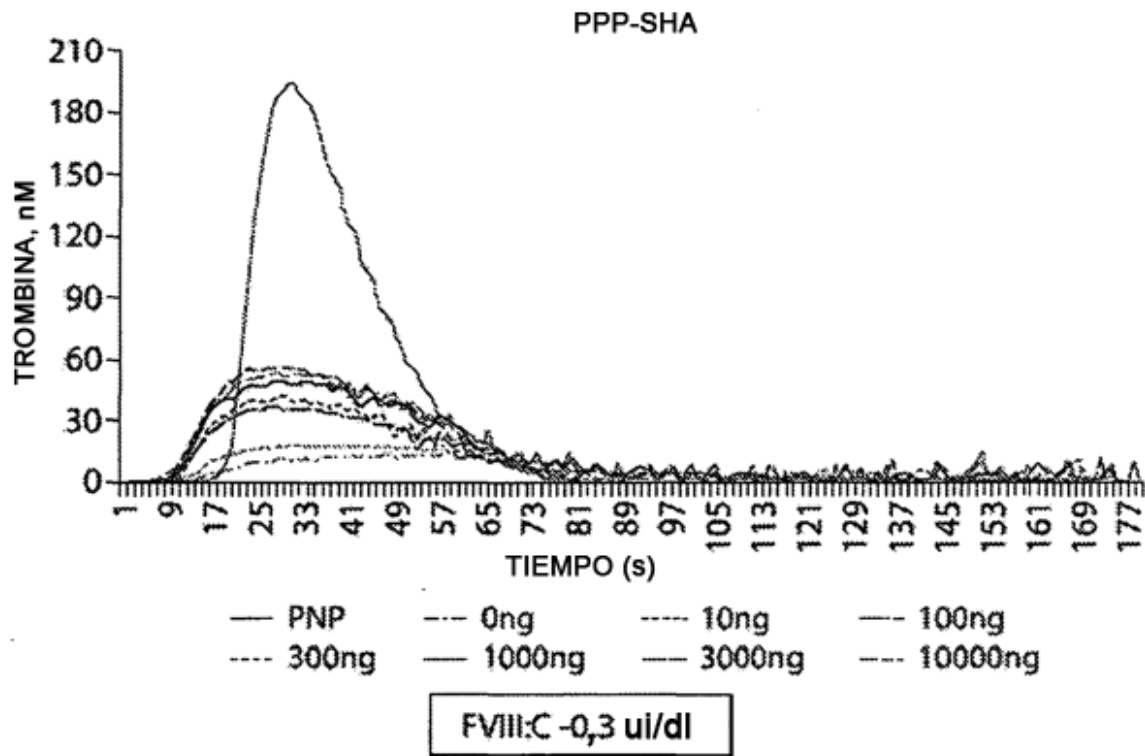


Fig. 93



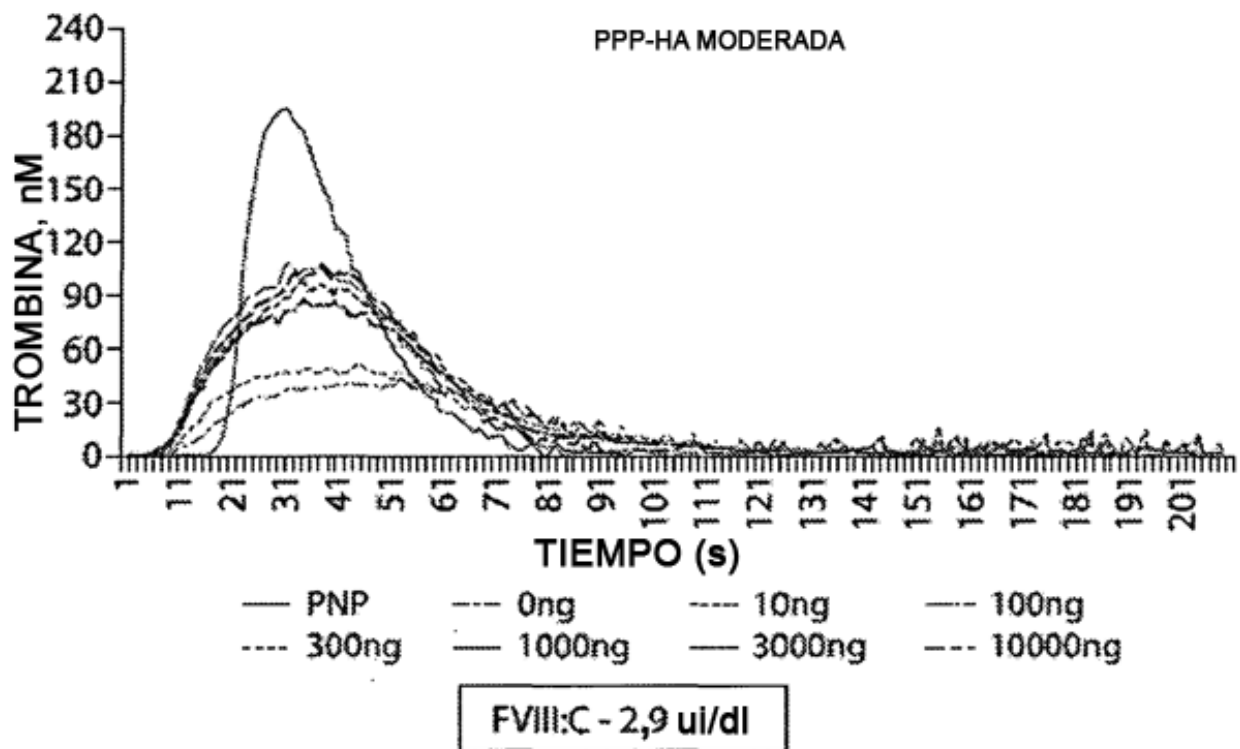
CONC. DE 19499 ng/ml	EPT [TROMBINA, nM. MIN] 1341-2171	PICO [TROMBINA, nM] 176-256
	1607,5	193,50
10000	1500,5	202,10
3000	1537,5	206,02
1000	1521,5	208,69
300	1448,5	203,53
100	1497,5	207,64
10	1640,0	208,28
0	1601,5	203,57

Fig. 94



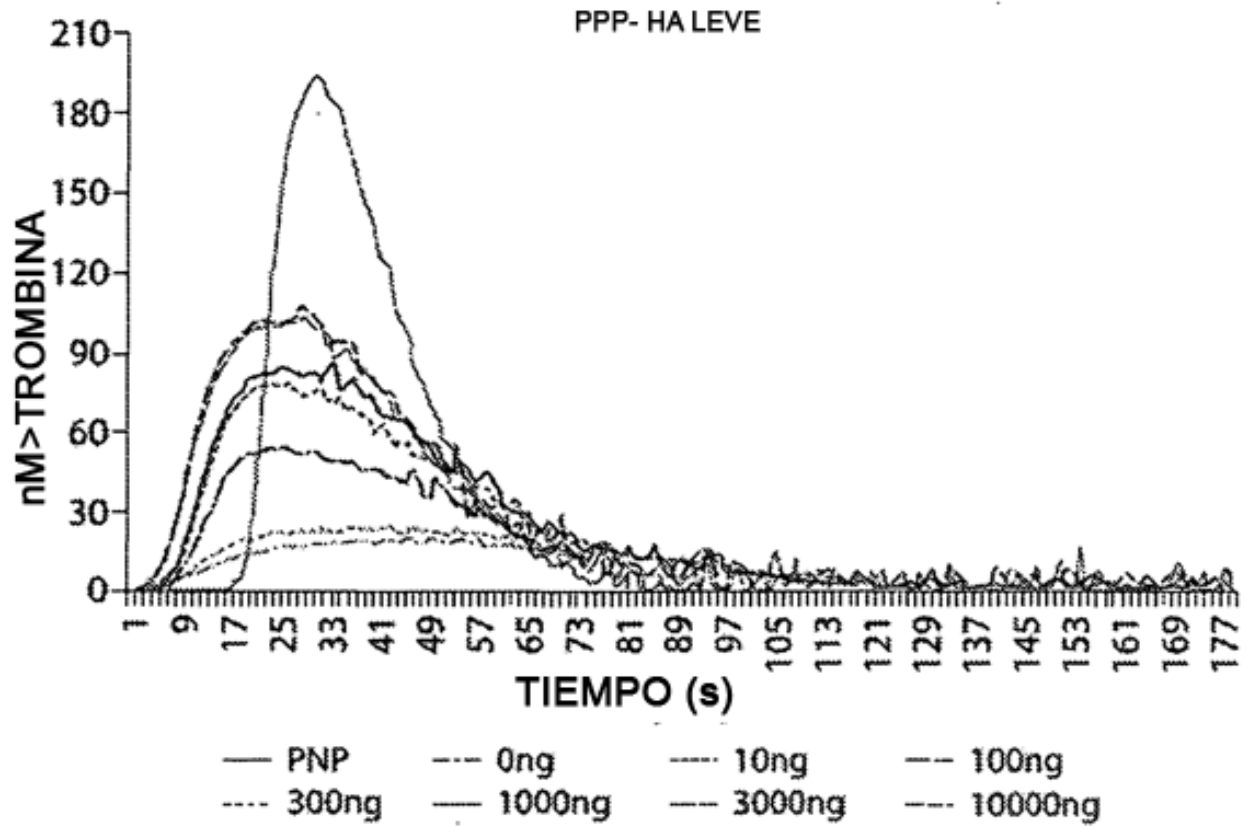
CONC. DE 19499 ng/ml	EPT [TROMBINA, nM .MIN] 1341-2171	PICO [TROMBINA, nM] 176-256
	1607,5	193,50
10000	818,5	56,60
3000	815,0	53,69
1000	799,0	49,46
300	631,0	41,08
100	570,0	36,33
10	356,5	17,94
0	300,5	14,25

Fig. 95



CONC. DE 19499 ng/ml	EPT [TROMBINA, nM.MIN] 1341-2171	PICO [TROMBINA, nM] 176-256
	1607,5	193,50
10000	1531,0	105,60
3000	1520,0	103,29
1000	1495,0	96,64
300	1492,5	94,66
100	1369,5	85,21
10	1013,5	48,64
0	954,0	40,62

Fig. 96



FVIII:C - 16,4 ui/dl

CONC. DE 19499 ng/ml	EPT [TROMBINA, nM.MIN] 1341-2171	PICO [TROMBINA, nM] 176-256
	1607,5	193,50
10000	1648,0	84,02
3000	1427,0	81,26
1000	1396,0	73,46
300	1136,0	66,43
100	1052,0	49,53
10	692,8	30,04
0	457,5	19,22

Fig. 97

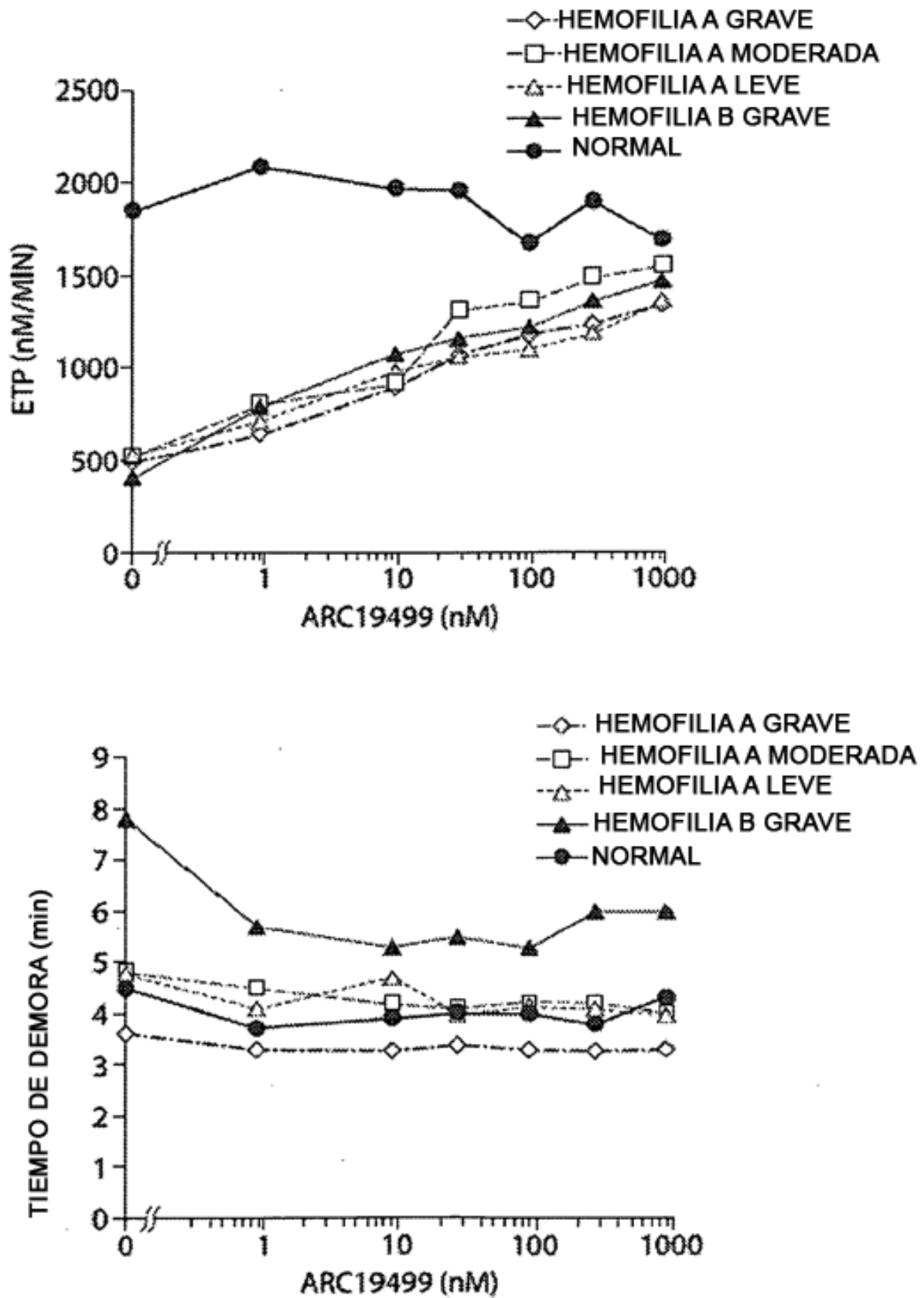


Fig. 98-1

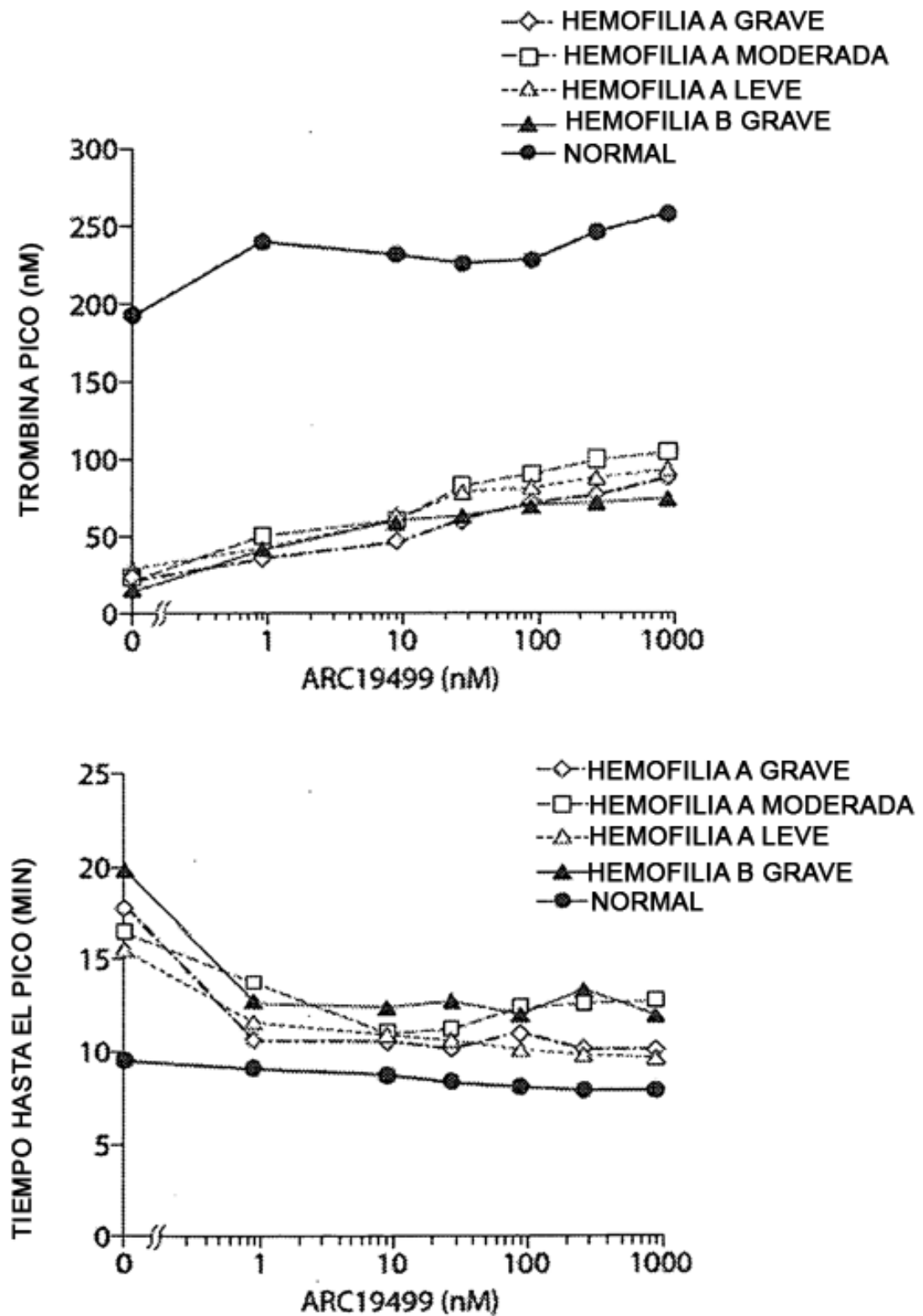


Fig. 98-2

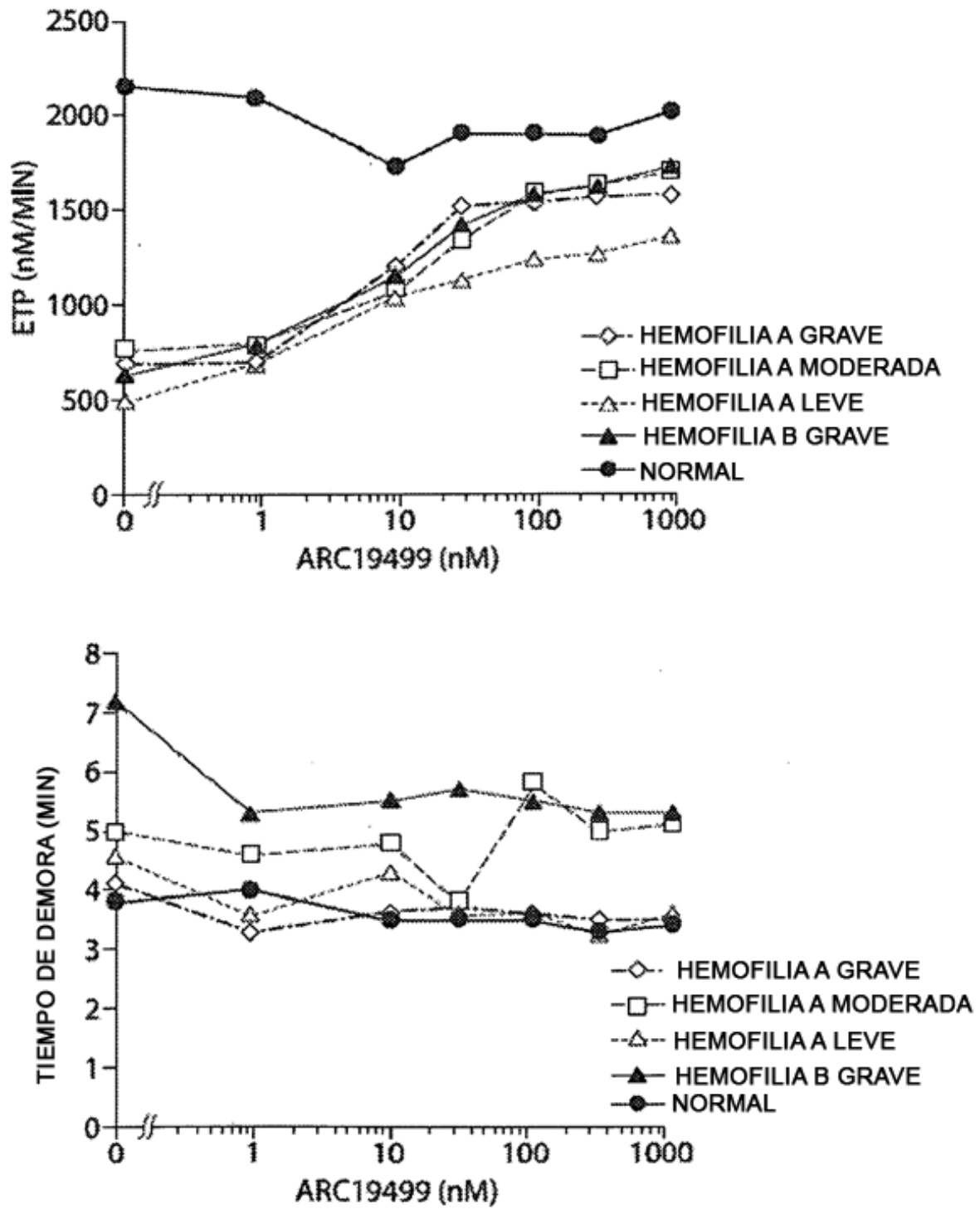


Fig. 99-1

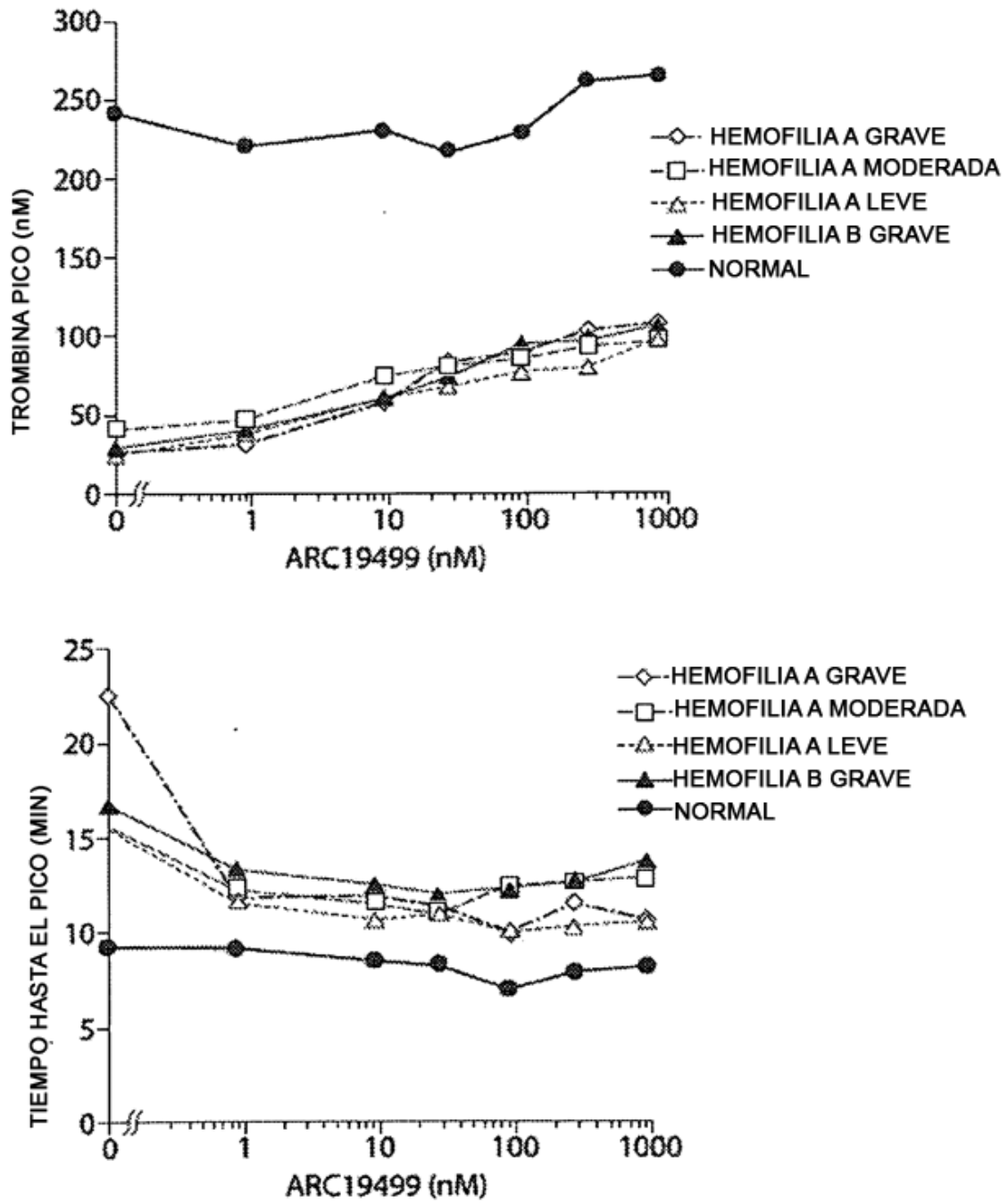


Fig. 99-2

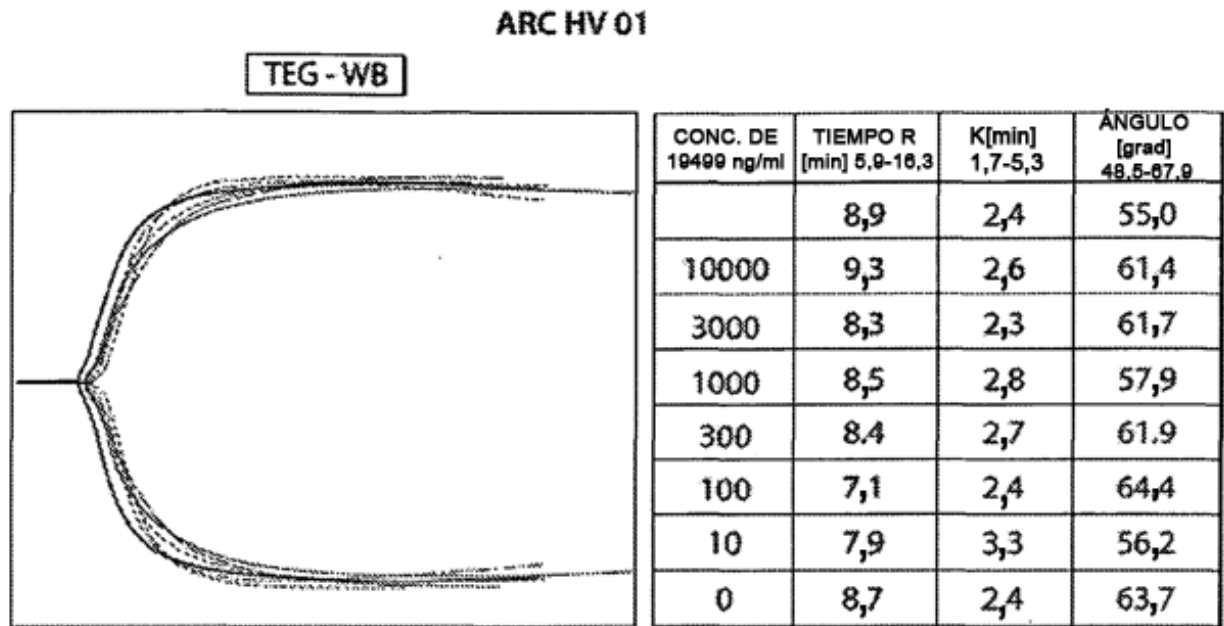


Fig. 100

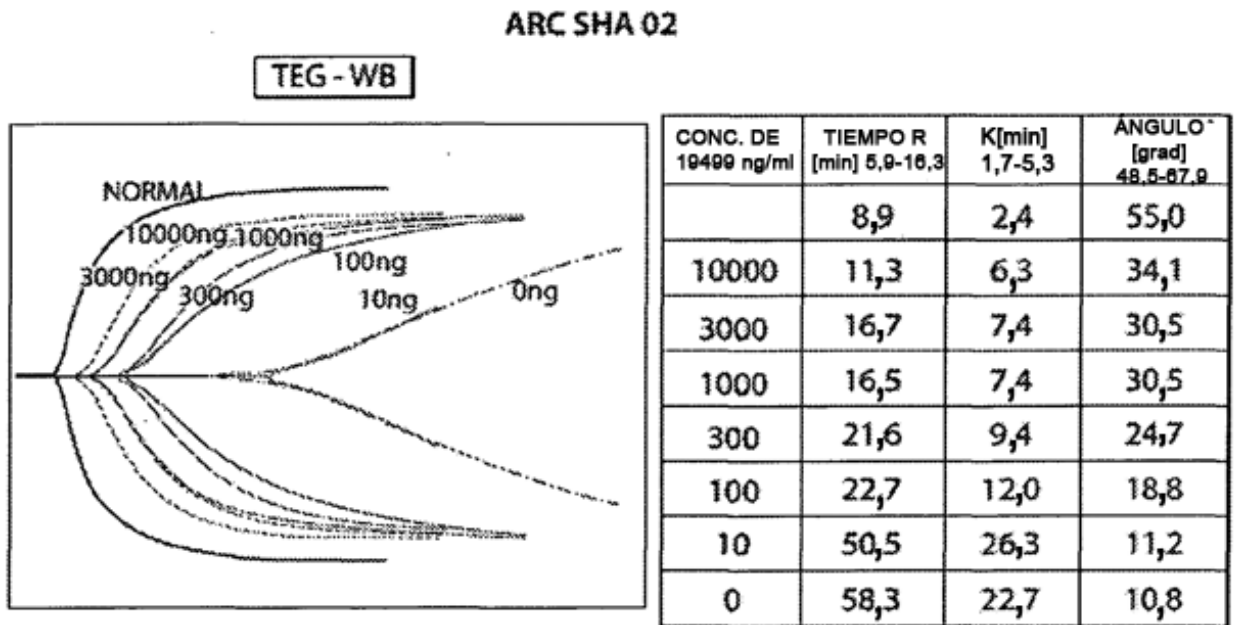
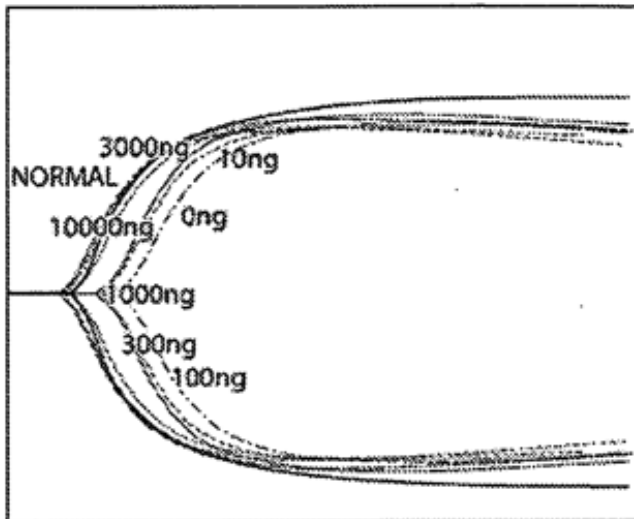


Fig. 101

ARC MoHa 01

TEG - WB



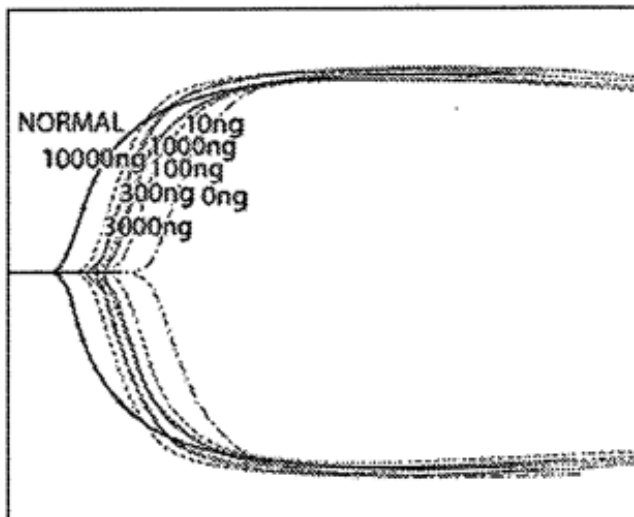
FVIII:C- 2,9 ui/dl

CONC. DE 10400 ng/ml	TIEMPO R [min] 5,9-18,3	K[min] 1,7-5,3	ÁNGULO [grad] 48,5-87,9
	8,9	2,4	55,0
10000	7,3	3,5	52,0
3000	6,8	3,9	50,2
1000	8,1	3,9	51,1
300	8,1	3,9	48,0
100	11,3	4,0	49,5
10	11,3	4,5	47,0
0	13,2	4,4	39,4

Fig. 102

ARC MiHA 01

TEG - WB



FVIII:C- 8,8 ui/dl

CONC. DE 10400 ng/ml	TIEMPO R [min] 5,9-18,3	K[min] 1,7-5,3	ÁNGULO [grad] 48,5-87,9
	8,9	2,4	55,0
10000	11,8	3,3	54,5
3000	12,8	3,4	52,6
1000	13,4	3,4	50,2
300	14,0	3,4	48,3
100	14,7	3,5	34,5
10	15,8	3,6	30,0
0	19,8	3,7	30,7

Fig. 103

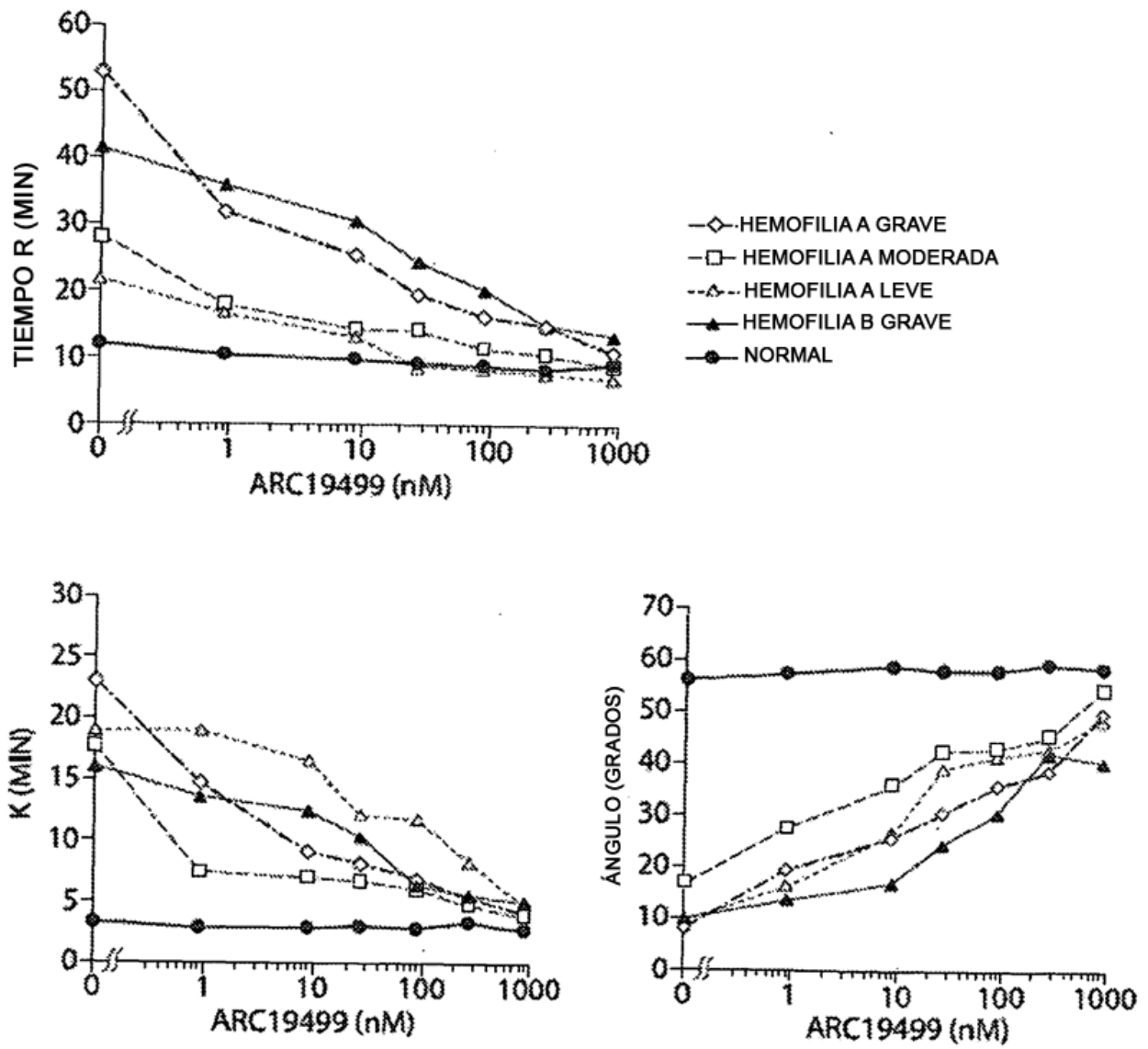
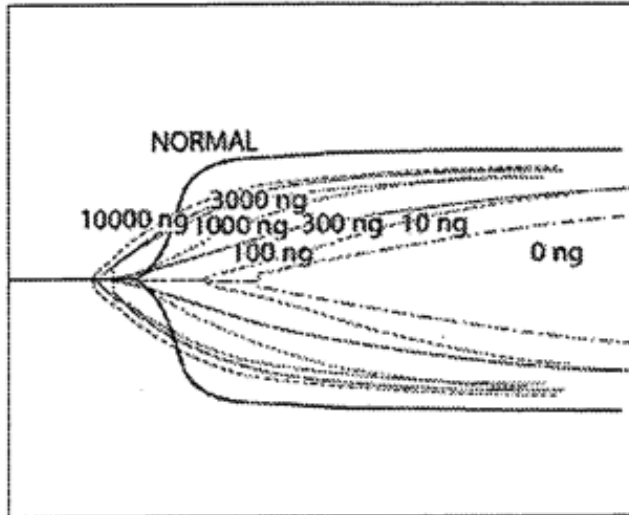


Fig. 104

ARC SHA 02

TEG - PPP



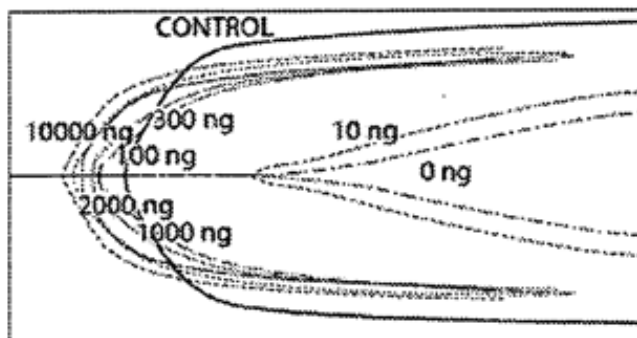
CONC. DE 10400 ng/ml	TIEMPO R [min] 10,6-15,6	K[min] 1,2-14,8	ÁNGULO [grad] 32,1-56,7
	14,8	4,6	49,4
10000	9,6	12,9	38,8
3000	10,7	14,9	29,0
1000	11,4	18,0	25,0
300	14,2	21,0	14,4
100	14,6	21,0	14,2
10	23,6	22,0	9,9
0	26,7	23,0	8,2

FVIII:C - 0,3

Fig. 105

ARC MoHA 01

TEG - PPP



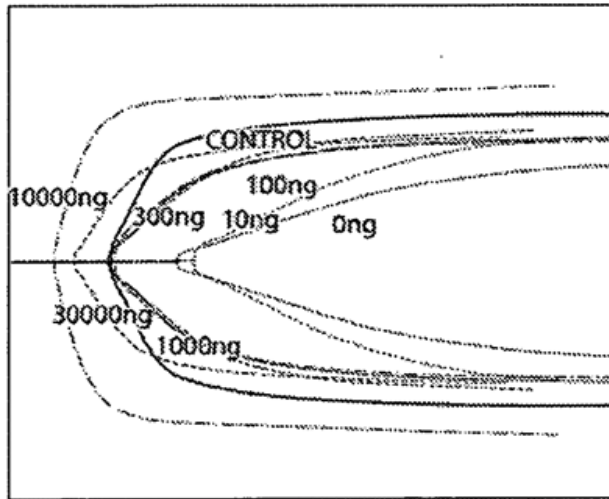
CONC. DE 10400 ng/ml	TIEMPO R [min] 10,6-15,6	K[min] 1,2-14,8	ÁNGULO [grad] 32,1-56,7
	14,8	4,6	49,4
10000	12,8	13,2	21,9
3000	13,7	14,5	20,9
1000	10,6	20,1	18,3
300	12,8	21,3	16,4
100	15,6	22,5	15,2
10	16,5	25,3	10,2
0	25,2	30,1	4,2

FVIII:C - 2,9

Fig. 106

ARC MIHA 03

TEG - PPP



CONC. DE 19499 ng/ml	TIEMPO R [min] 10,6-15,6	K[min] 1,2-14,8	ÁNGULO [grad] 32,1-56,7
	14,8	4,6	49,4
10000	3,8	2,1	69,7
3000	5,5	10,9	49,7
1000	8,0	12,1	46,3
300	7,7	15,0	39,4
100	13,3	15,6	38,2
10	13,6	19,0	16,9
0	35,8	22,0	10,2

FVIII:C - 16,4

Fig. 107

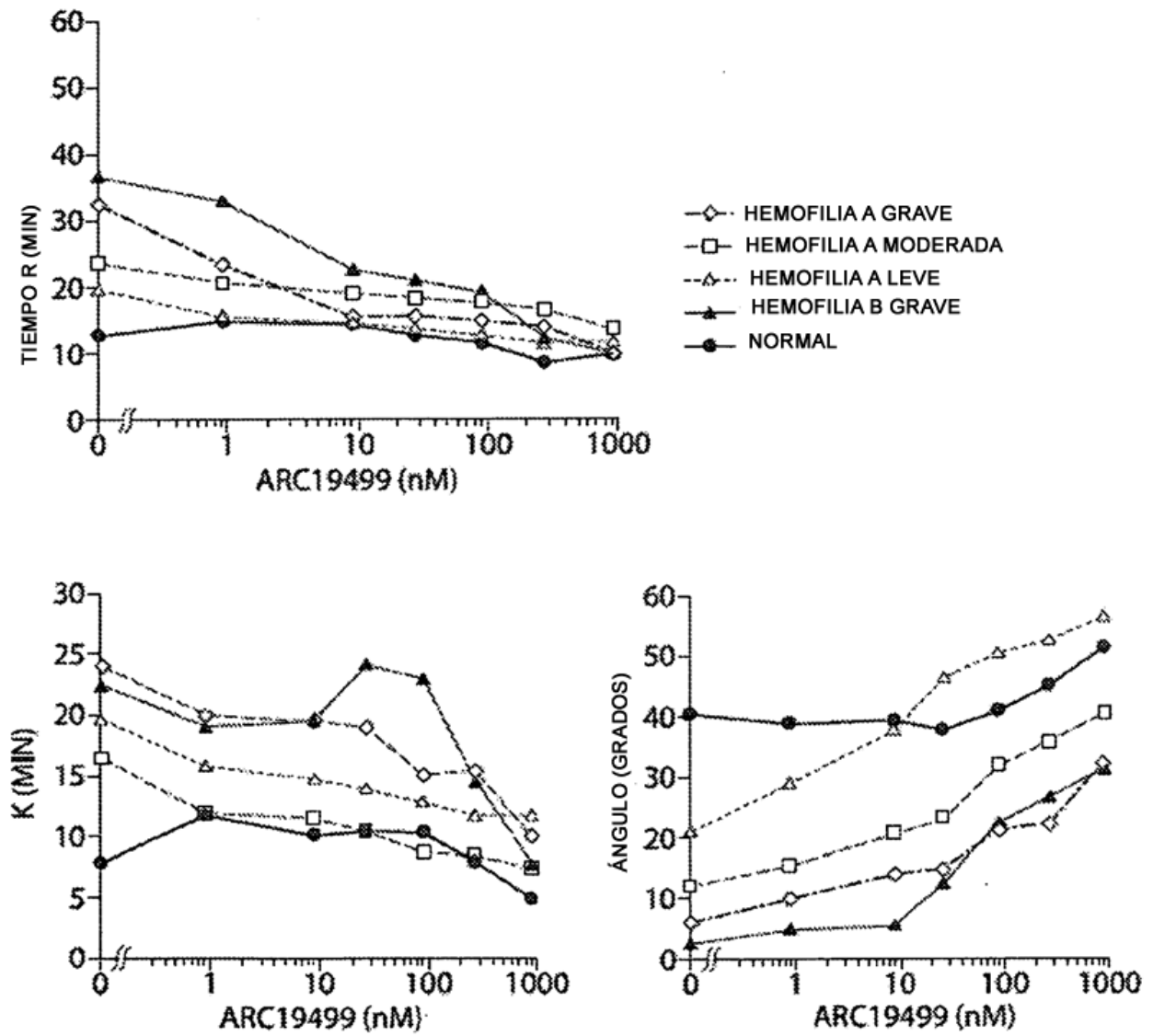


Fig. 108

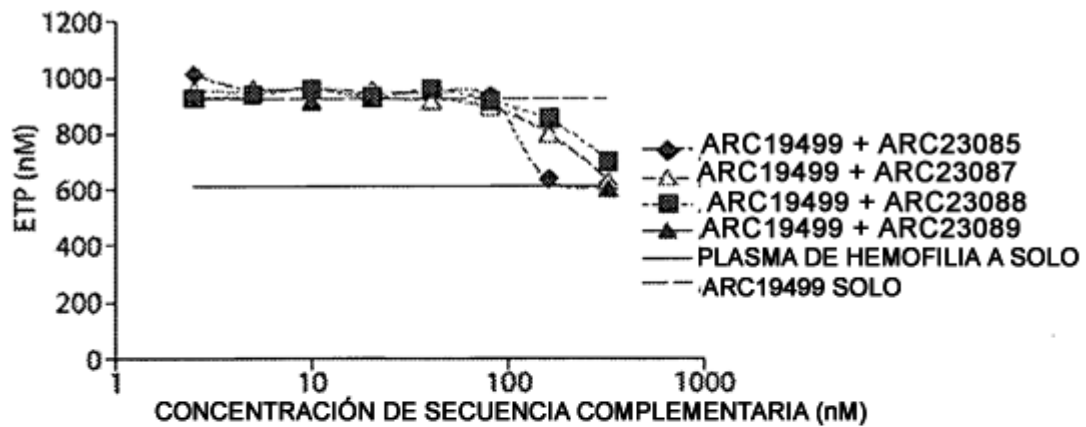


Fig. 109A

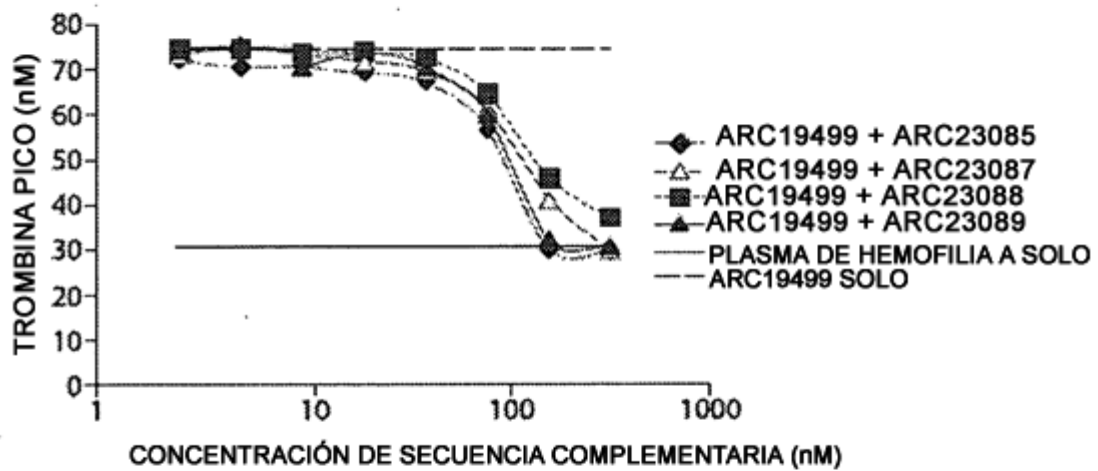


Fig. 109B

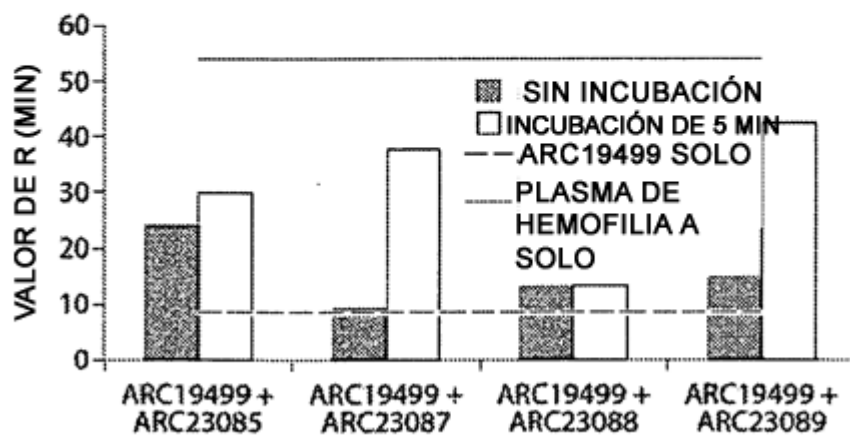


Fig. 109C

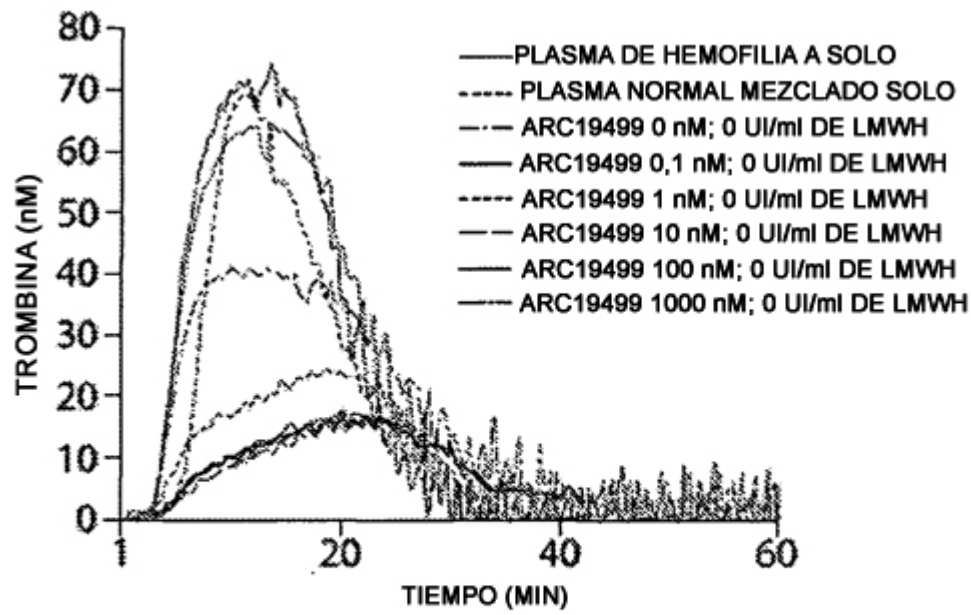


Fig. 110A

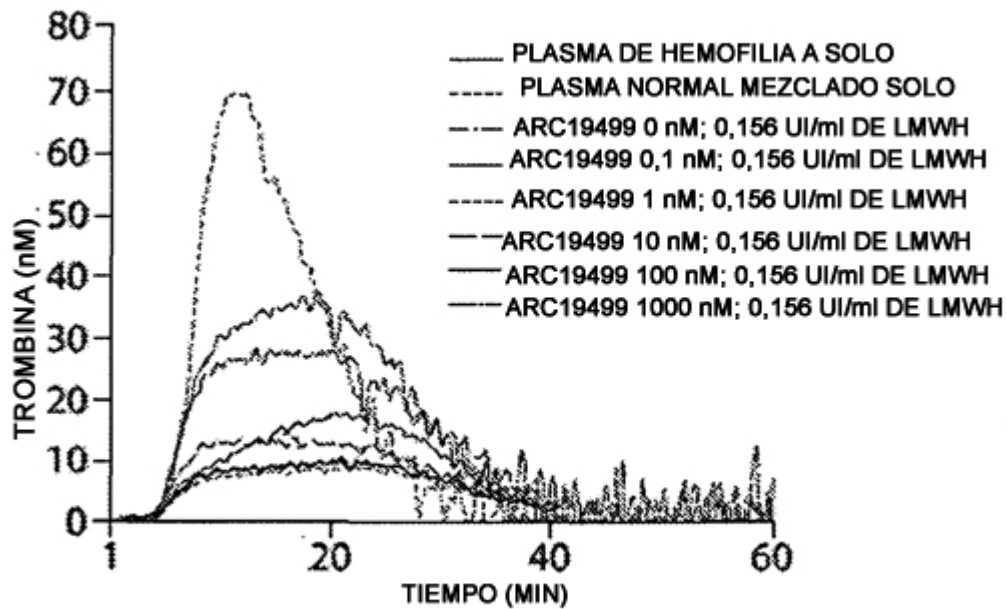


Fig. 110B

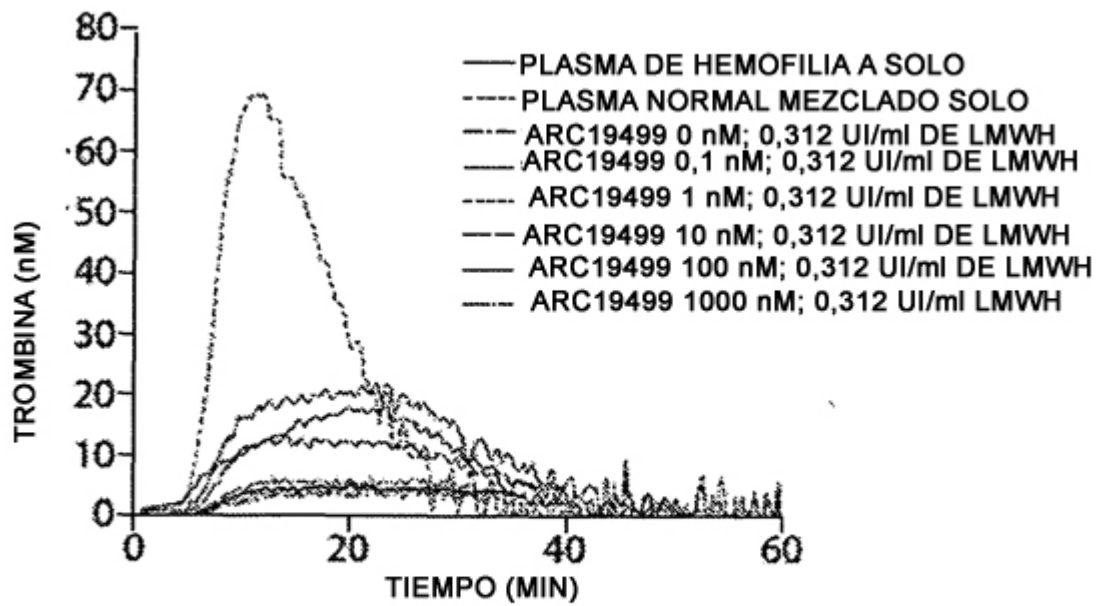


Fig. 110C

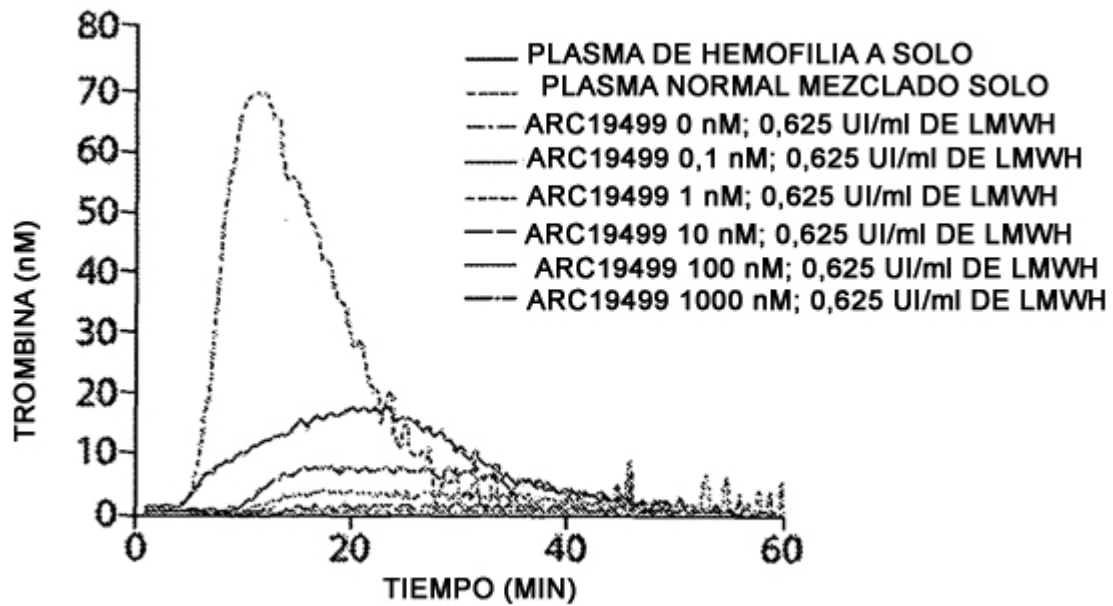


Fig. 110D

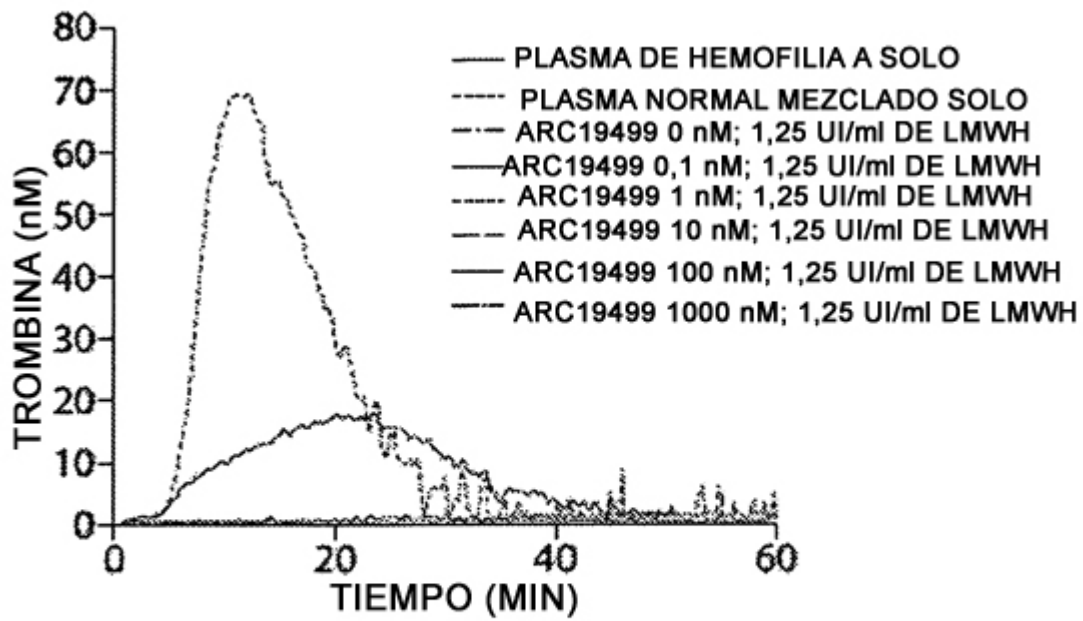


Fig. 110E

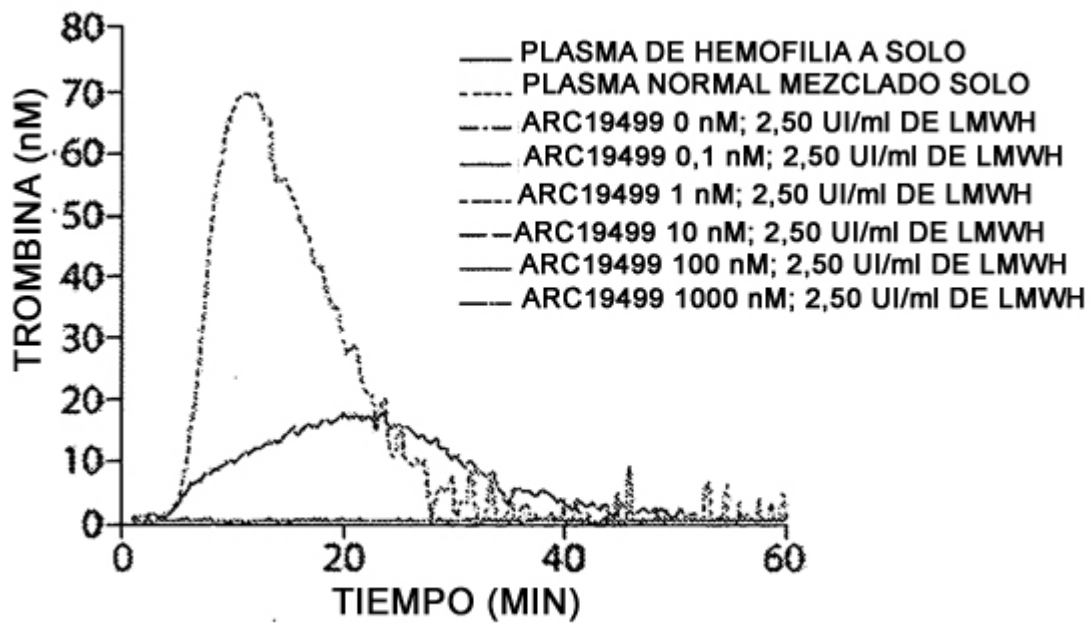


Fig. 110F

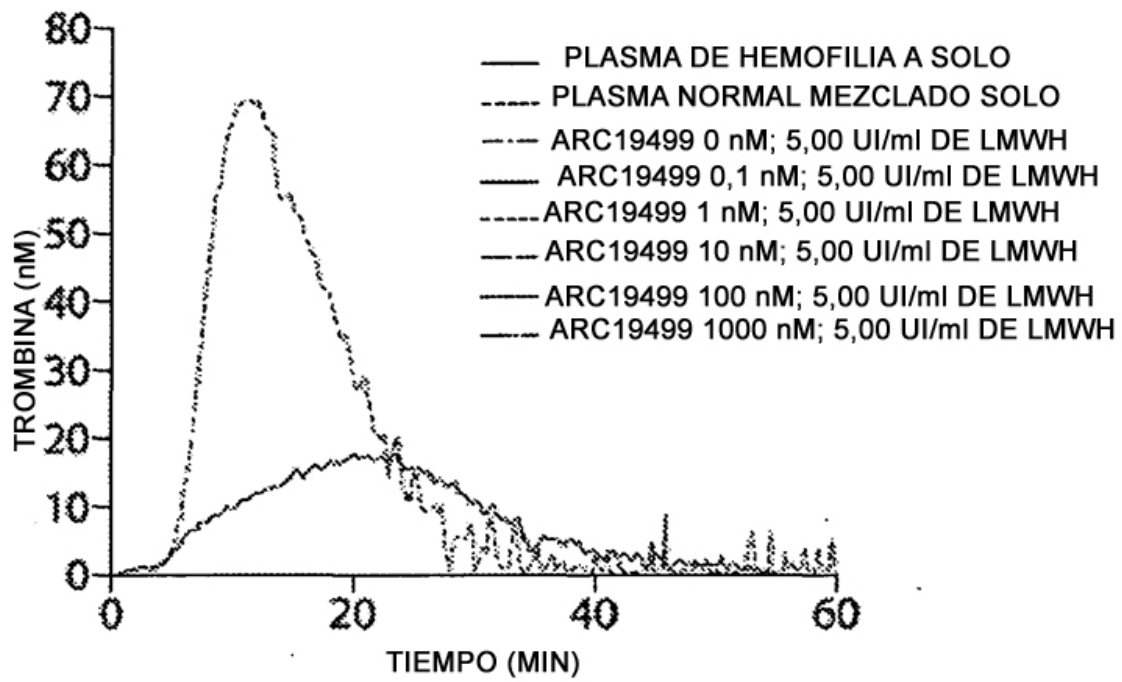


Fig. 110G

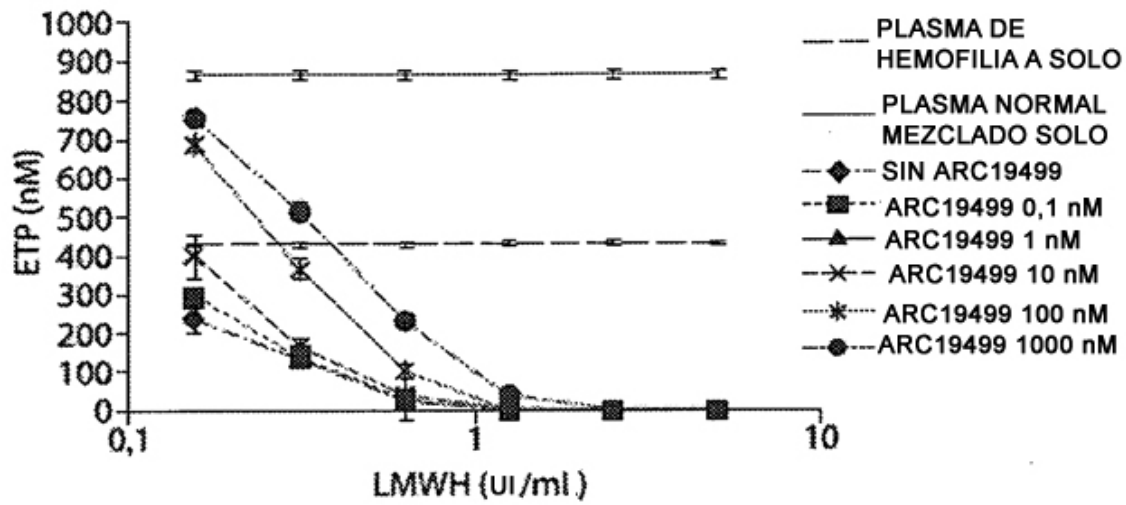


Fig. 111A

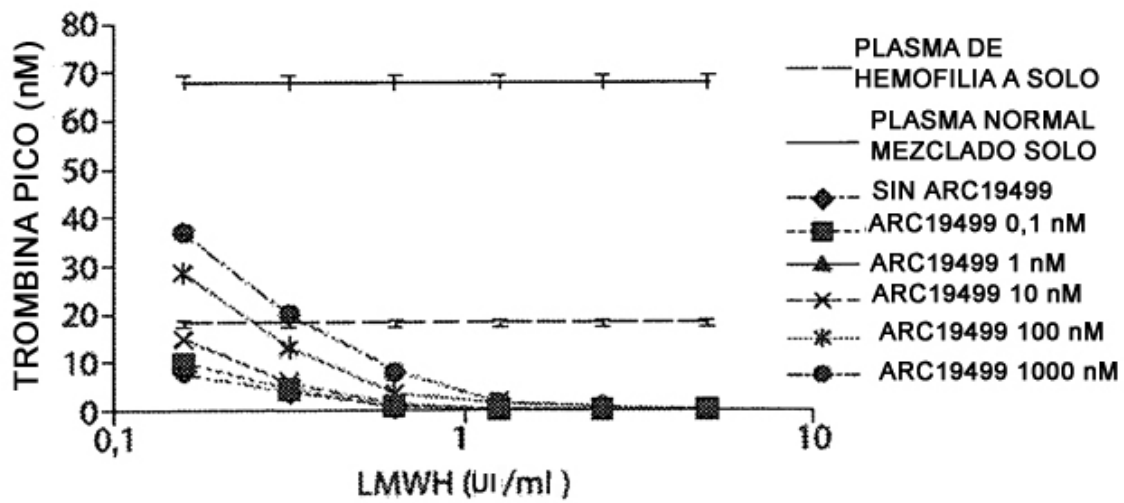
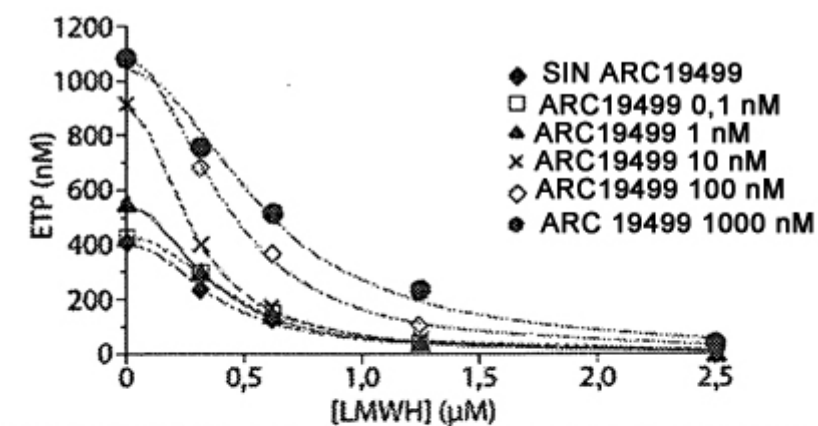
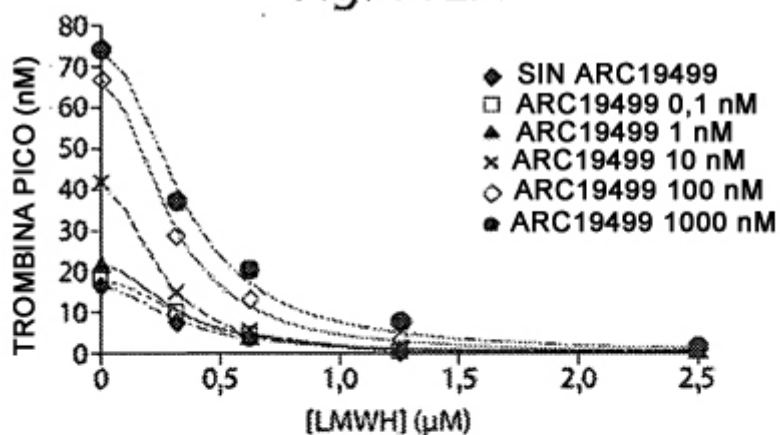


Fig. 111B



[ARC19499] nM	CI ₅₀ DE LMWH			
	ETP		TROMBINA PICO	
	CI ₅₀ (nM)	ERR. EST.	CI ₅₀ (nM)	ERR. EST.
0	381	24,3	299	18,0
0,1	449	13,3	353	13,6
1,0	345	9,4	290	8,2
10	274	7,7	226	5,9
100	418	16,5	268	5,9
1000	561	36,2	318	10,6

Fig. 112A



[ARC19499] nM	CI ₅₀ DE LMWH			
	ETP		TROMBINA PICO	
	CI ₅₀ (nM)	ERR. EST.	CI ₅₀ (nM)	ERR. EST.
0	381	24,3	299	18,0
0,1	449	13,3	353	13,6
1,0	345	9,4	290	8,2
10	274	7,7	226	5,9
100	418	16,5	268	5,9
1000	561	36,2	318	10,6

Fig. 112B

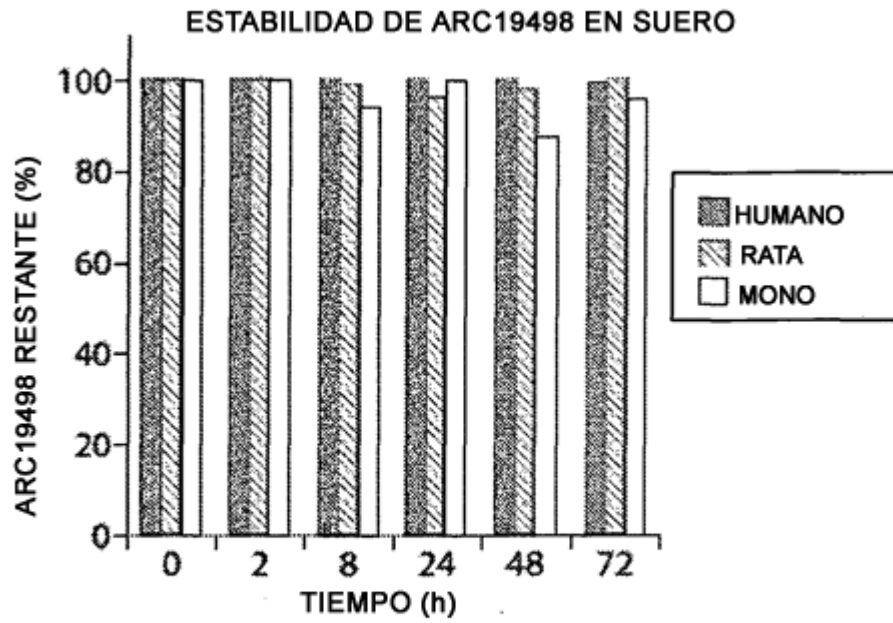


Fig. 113A

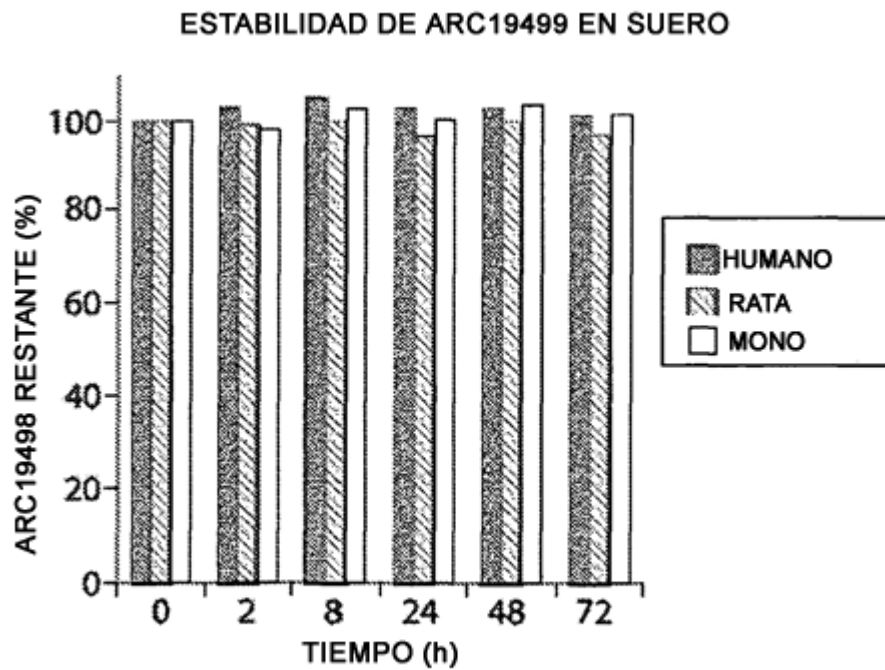


Fig. 113B

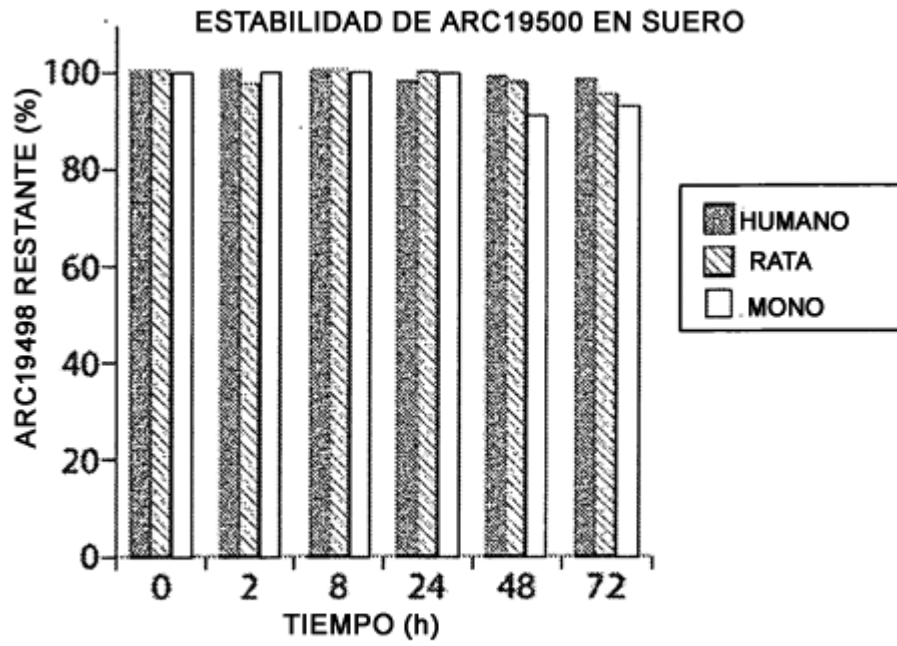


Fig. 113C

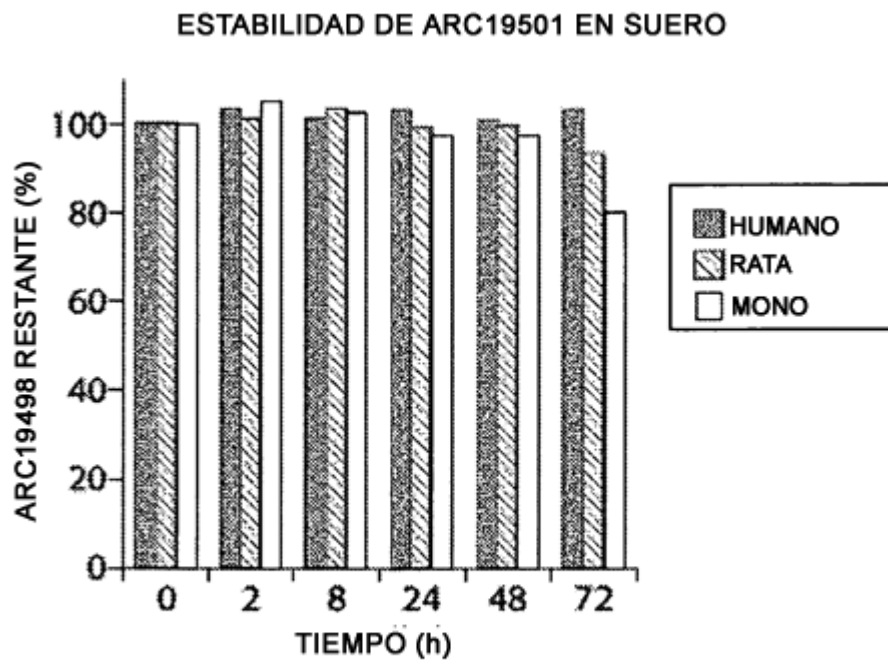


Fig. 113D

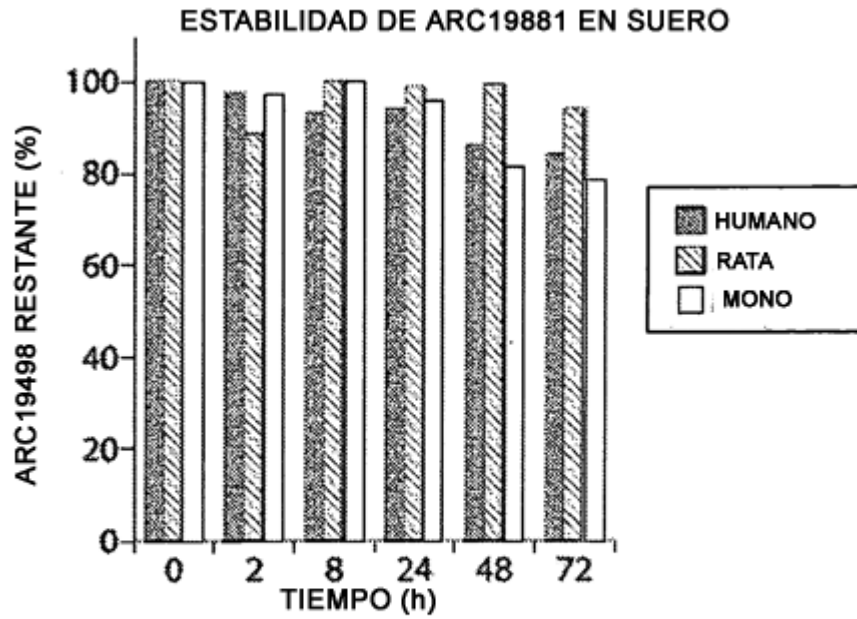


Fig. 113E

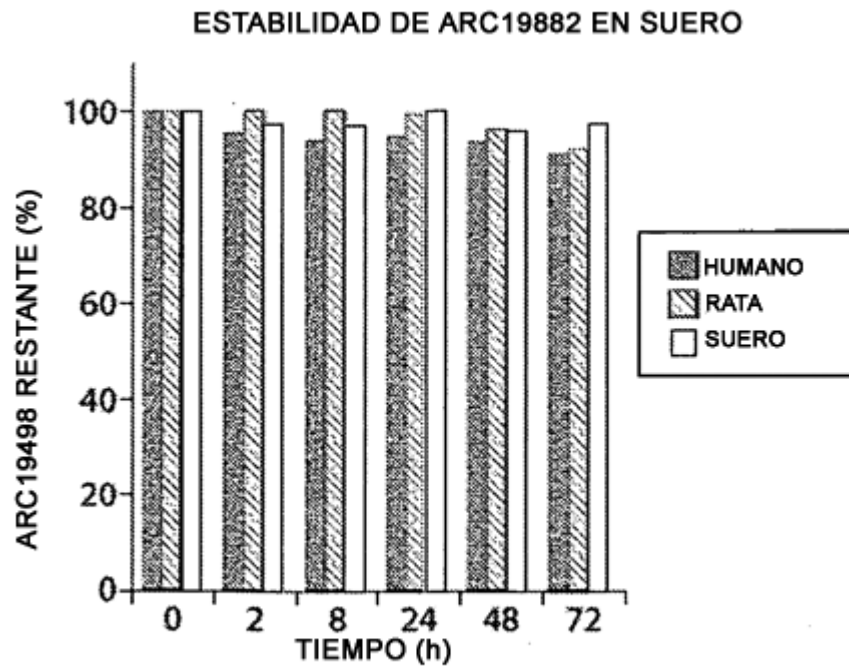


Fig. 113F

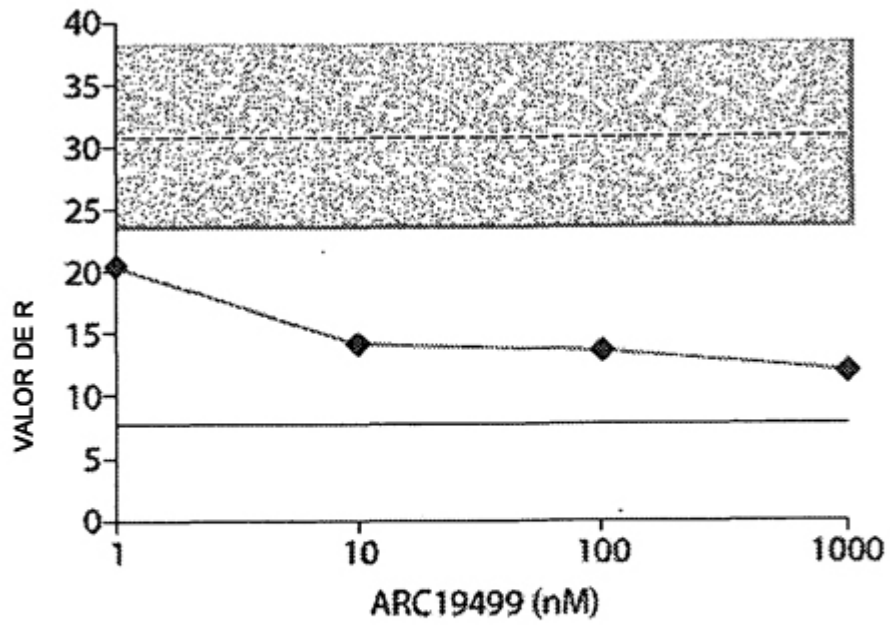


Fig. 114

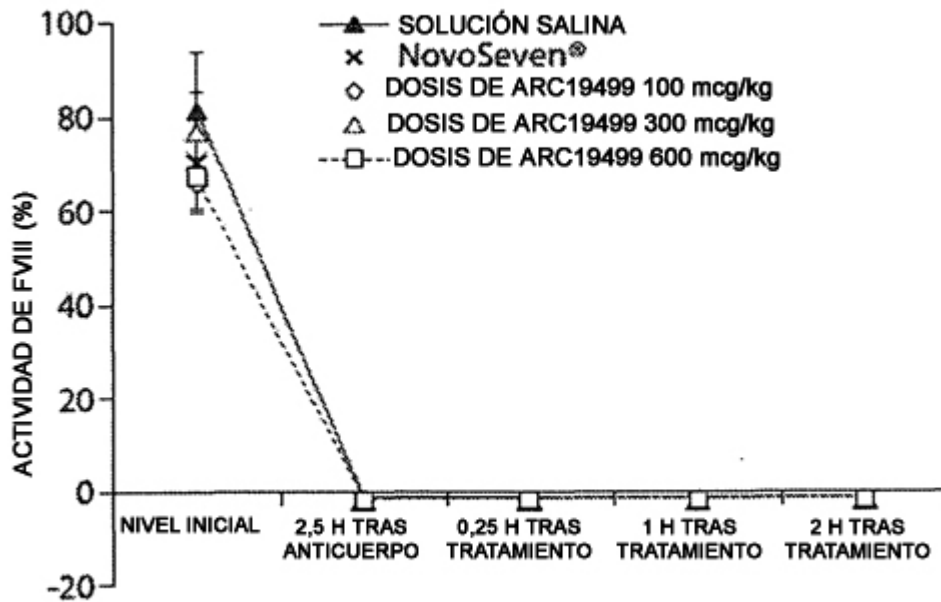


Fig. 115

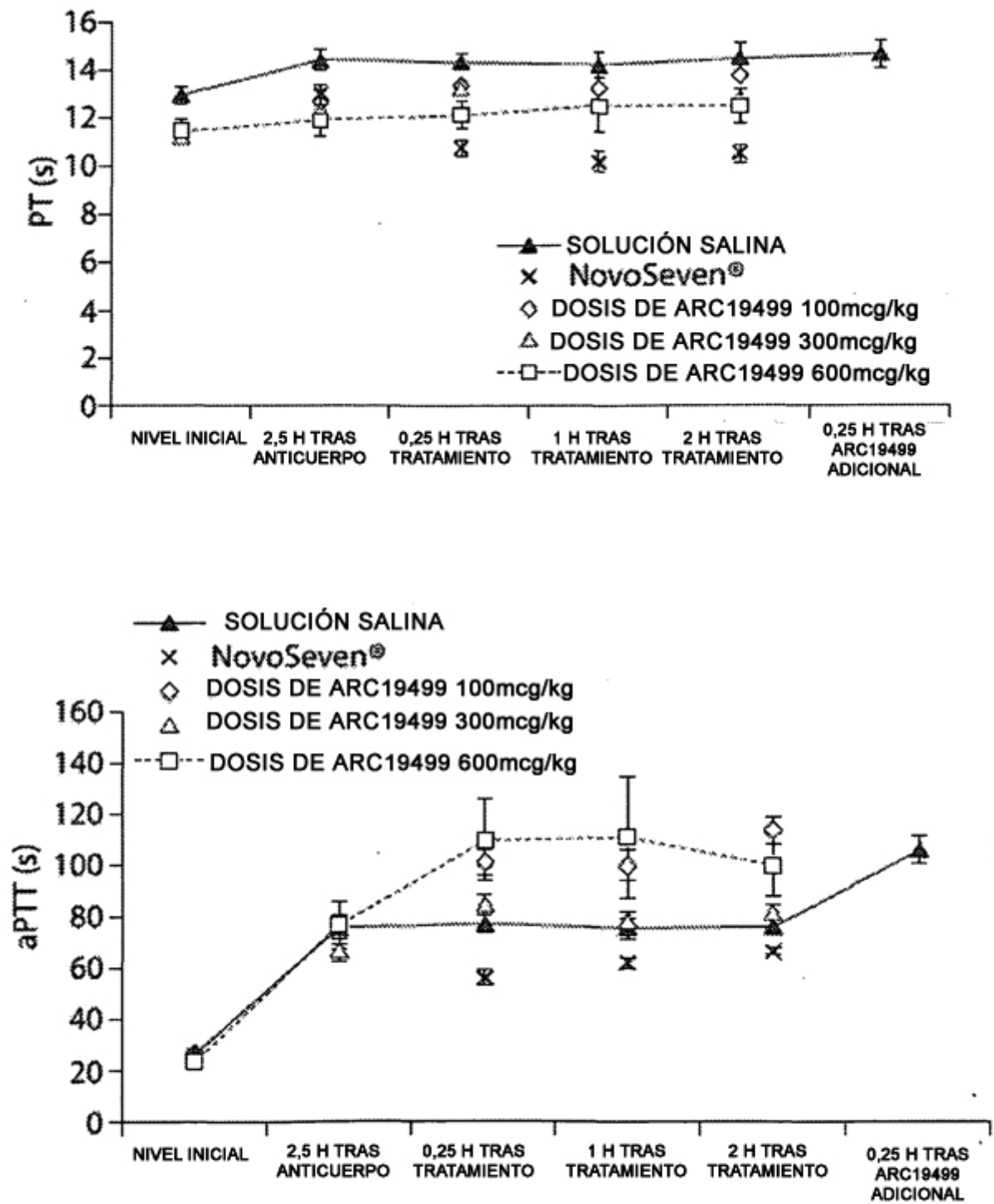


Fig. 116

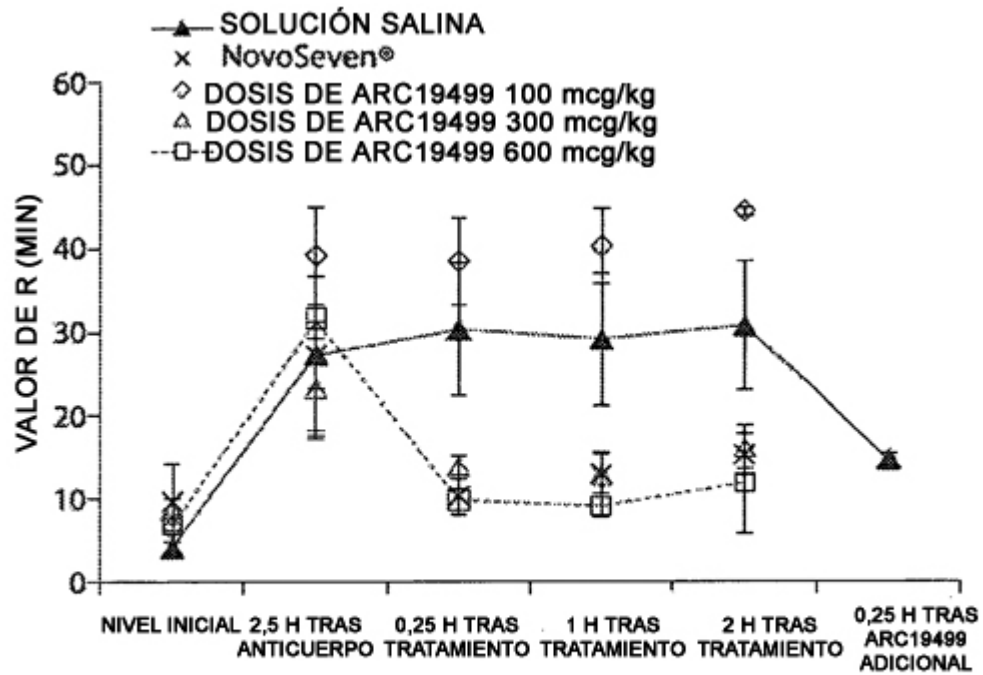


Fig. 117A

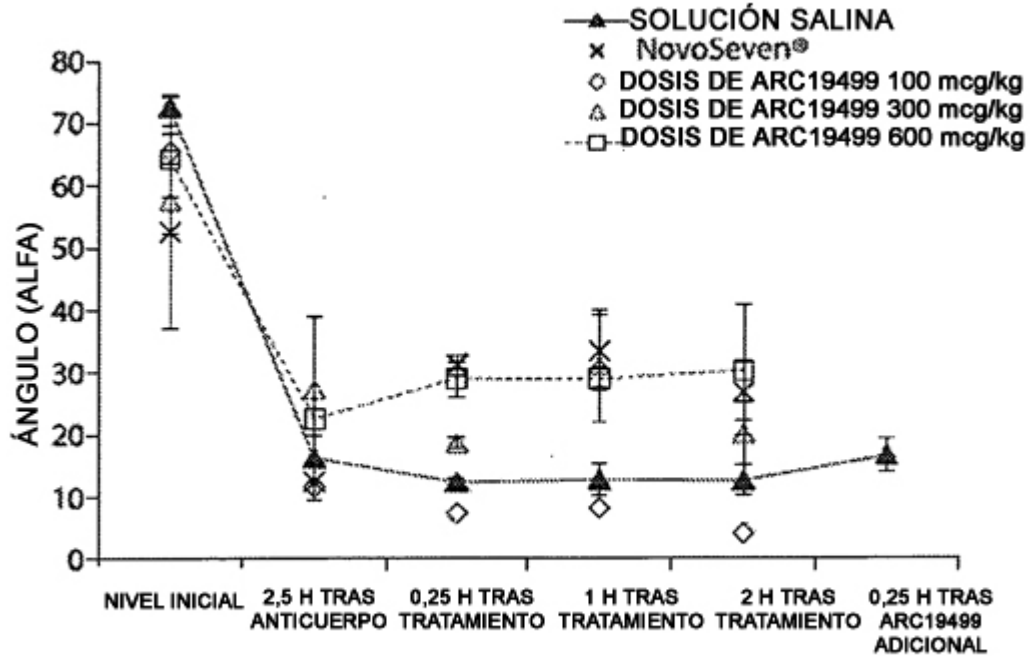


Fig. 117B

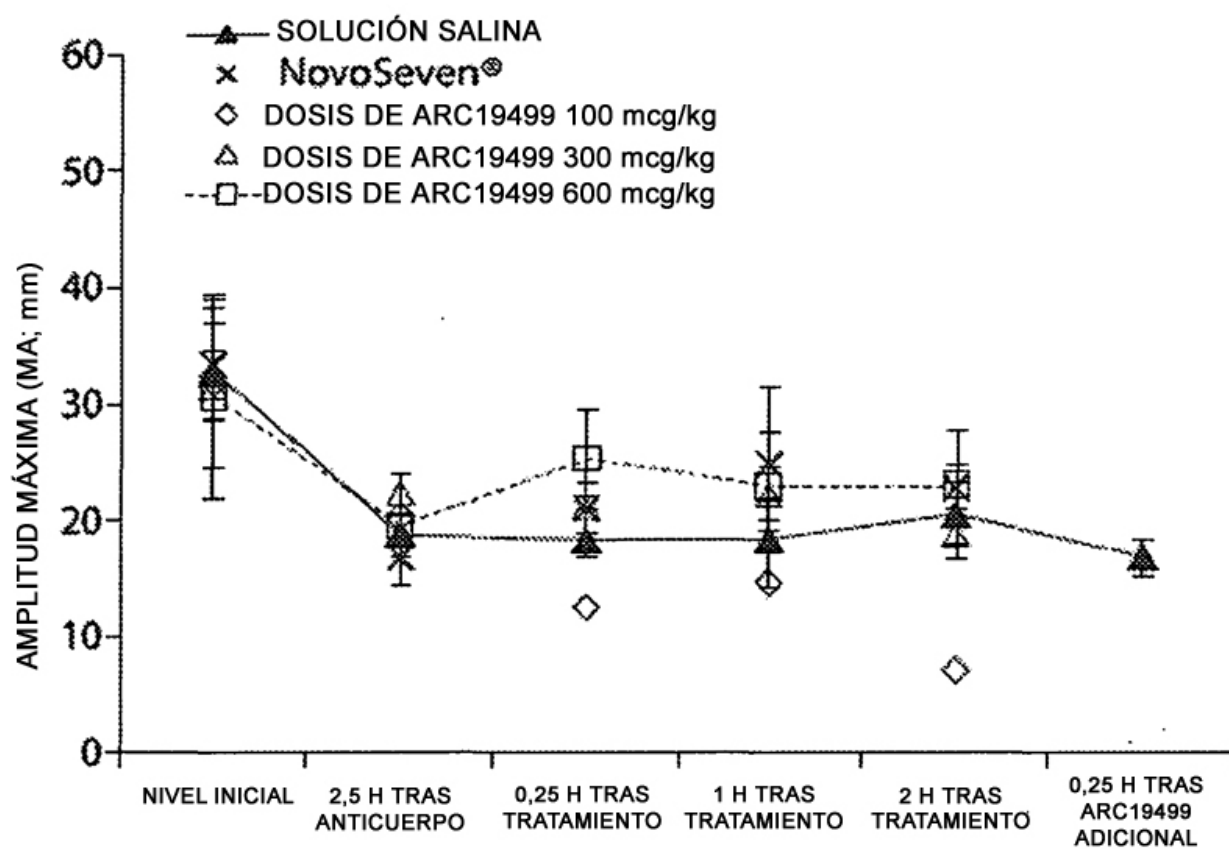
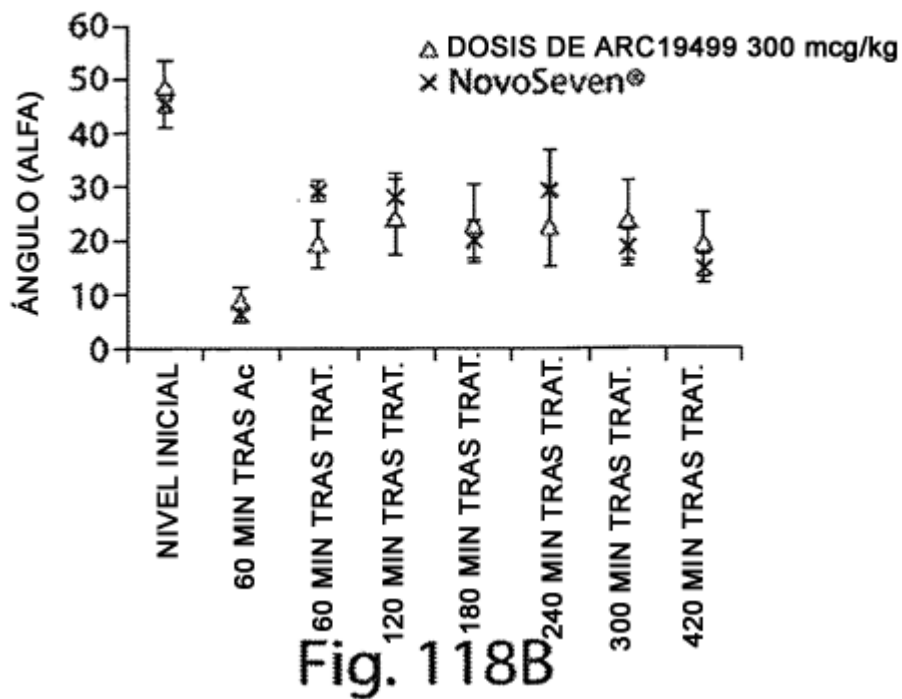
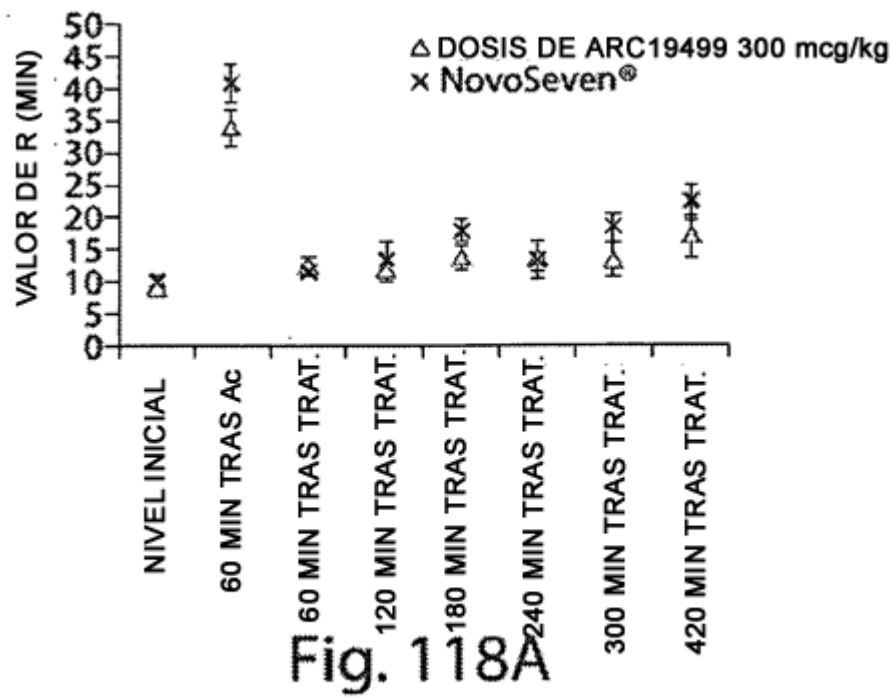


Fig. 117C



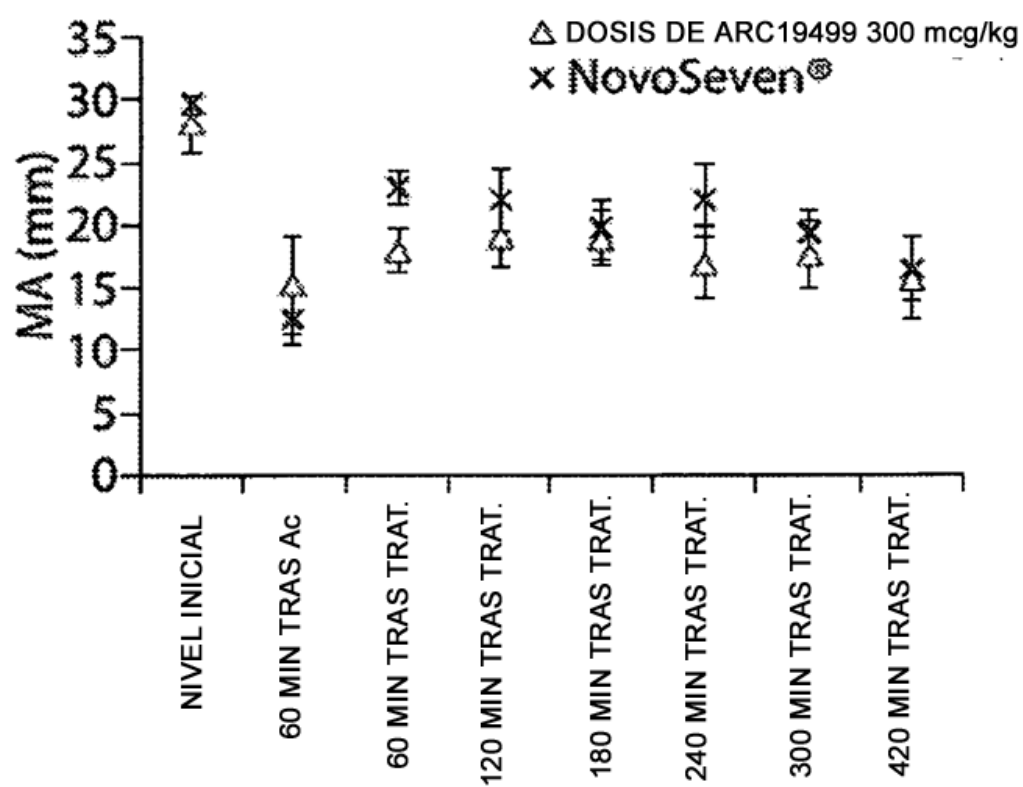


Fig. 118C

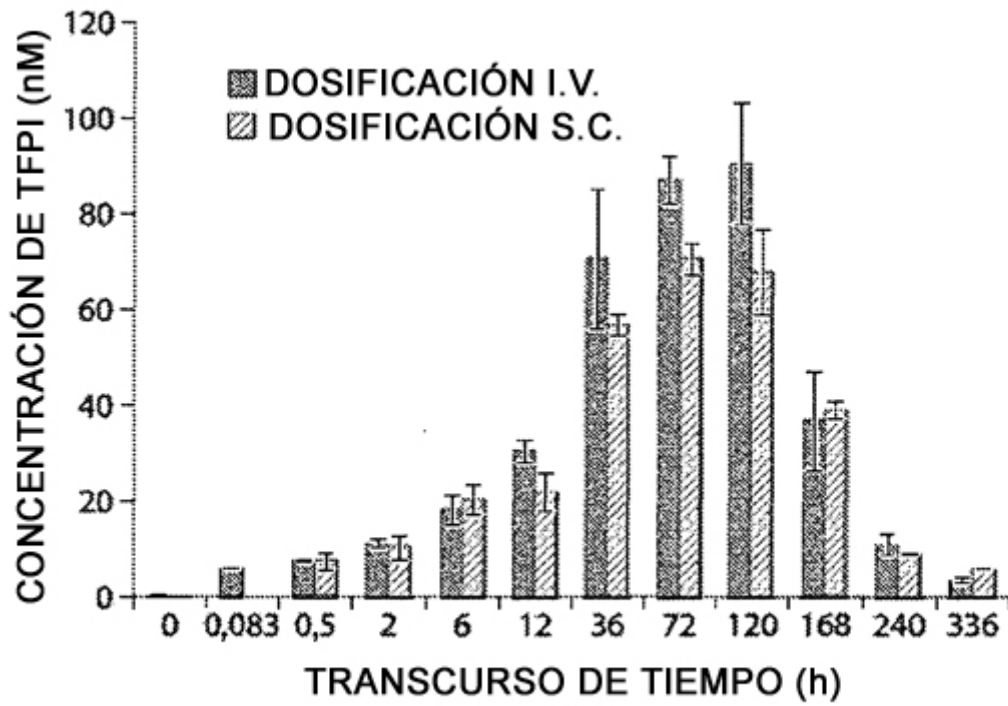


Fig. 119

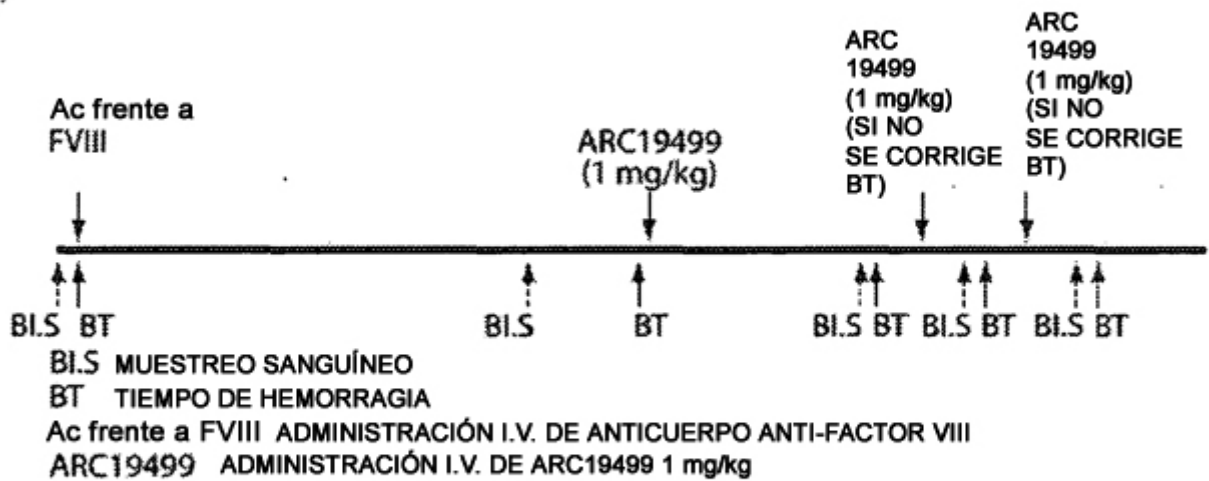


Fig. 120

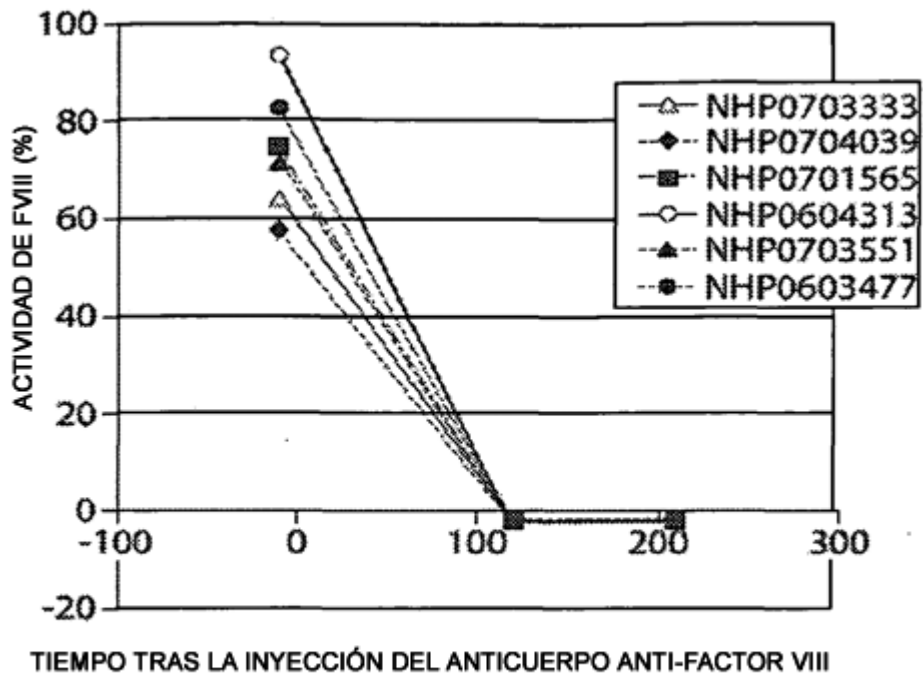


Fig. 121A

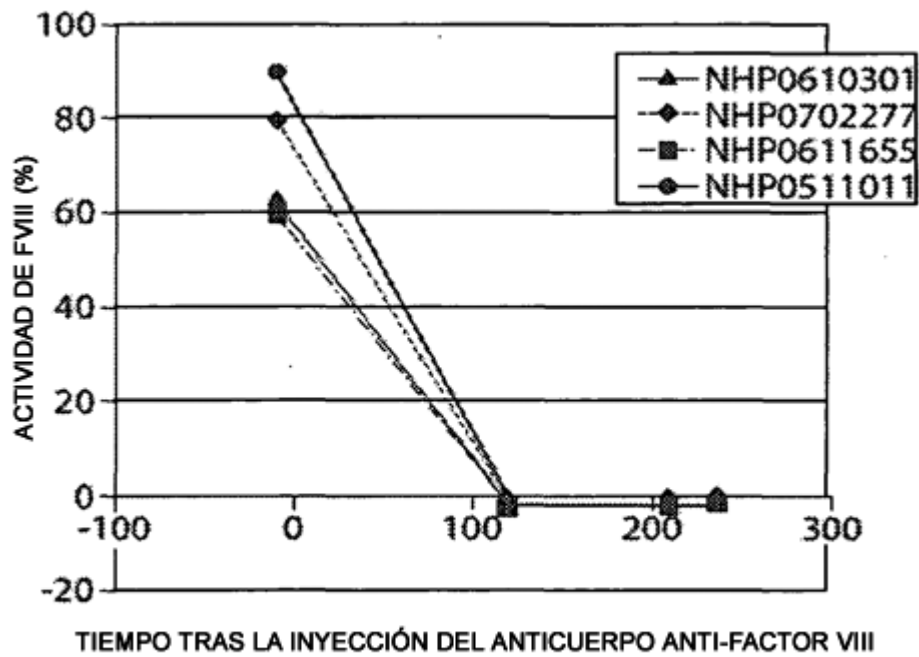


Fig. 121B

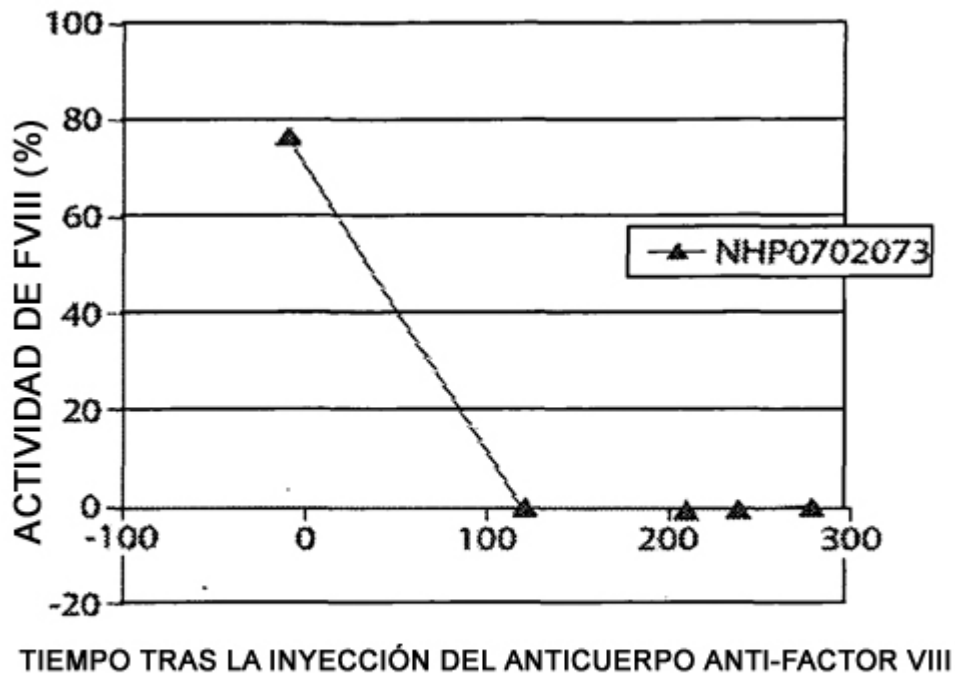


Fig. 121C

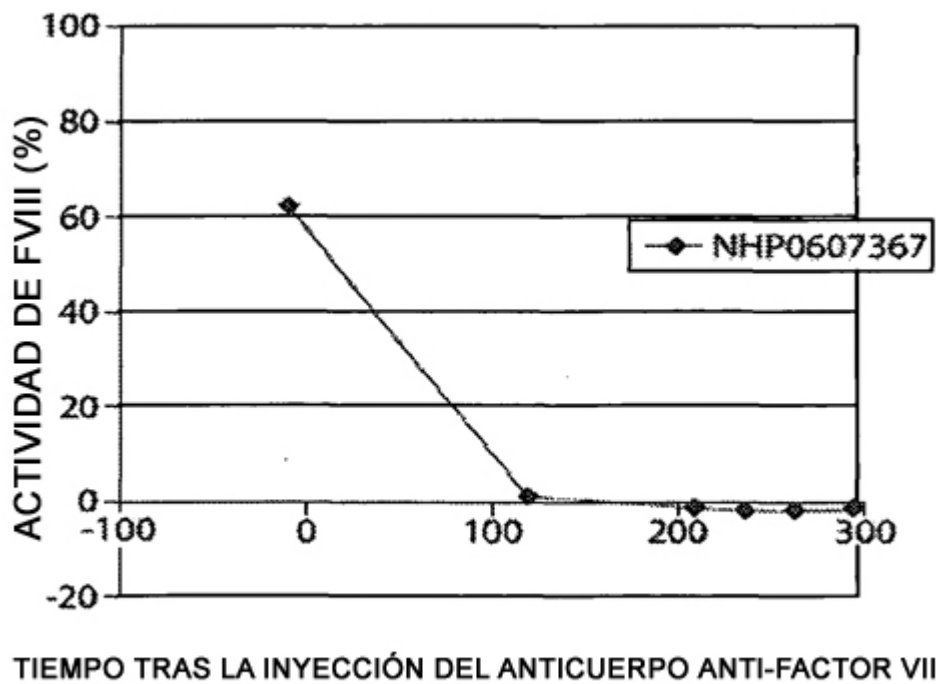


Fig. 121D

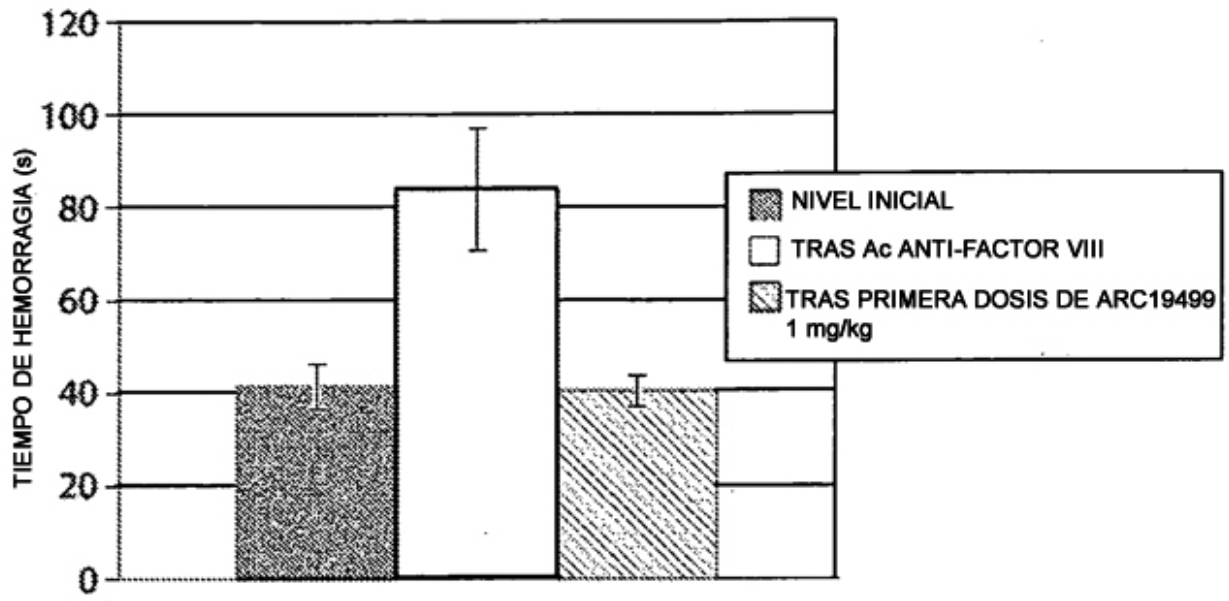


Fig. 122A

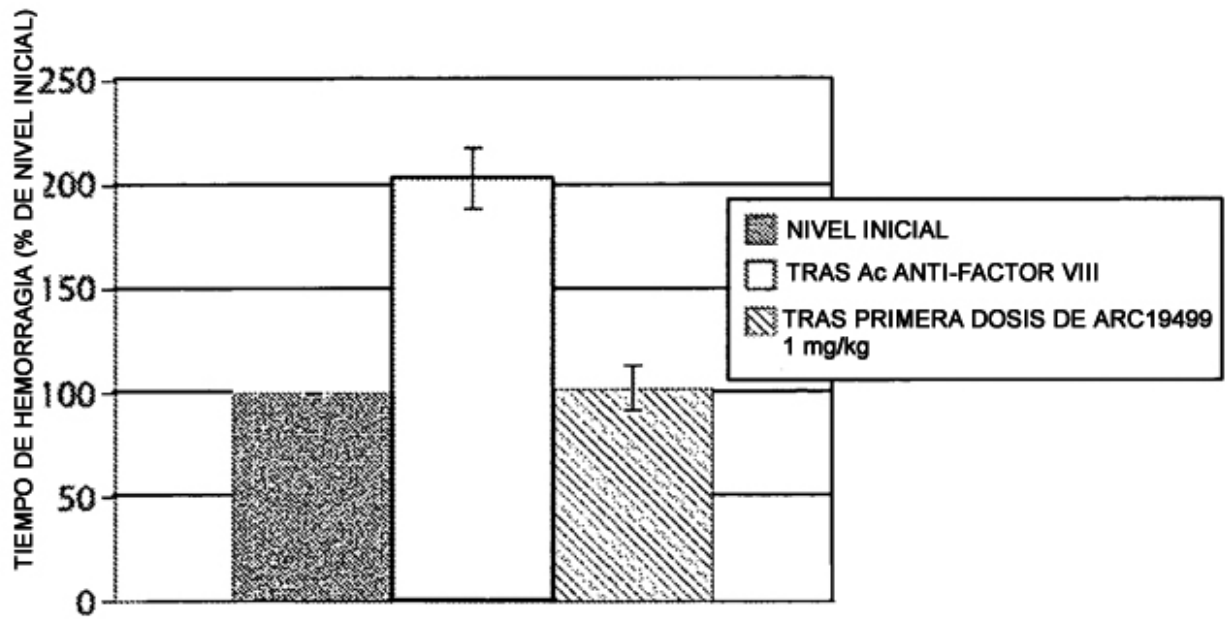


Fig. 122B

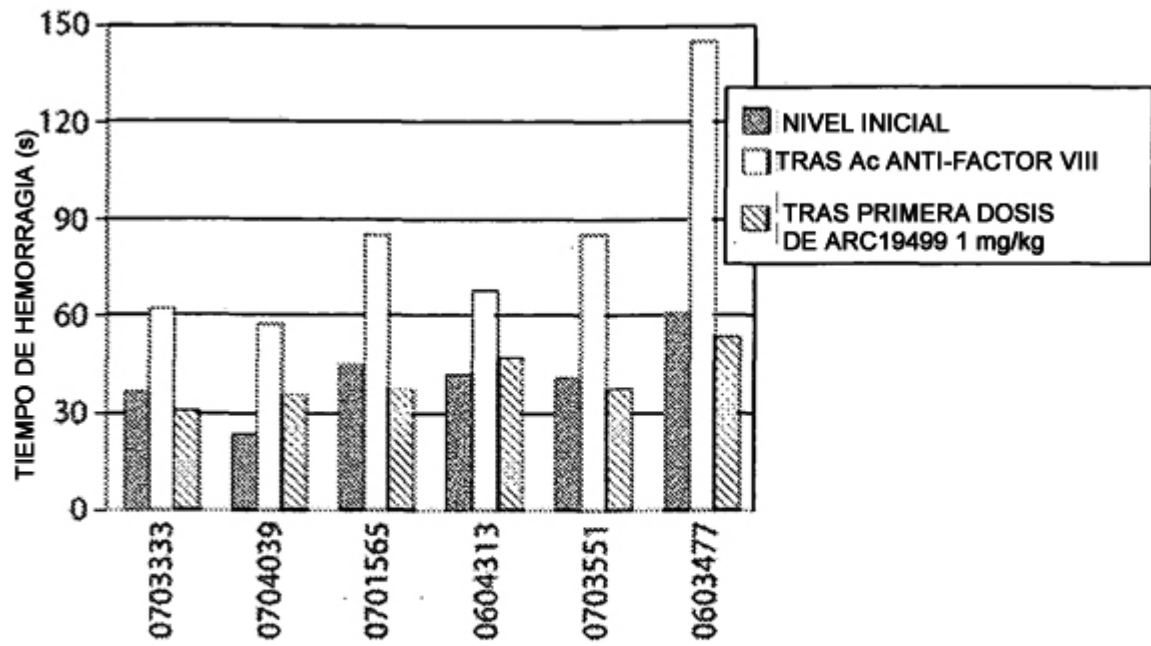


Fig. 123A

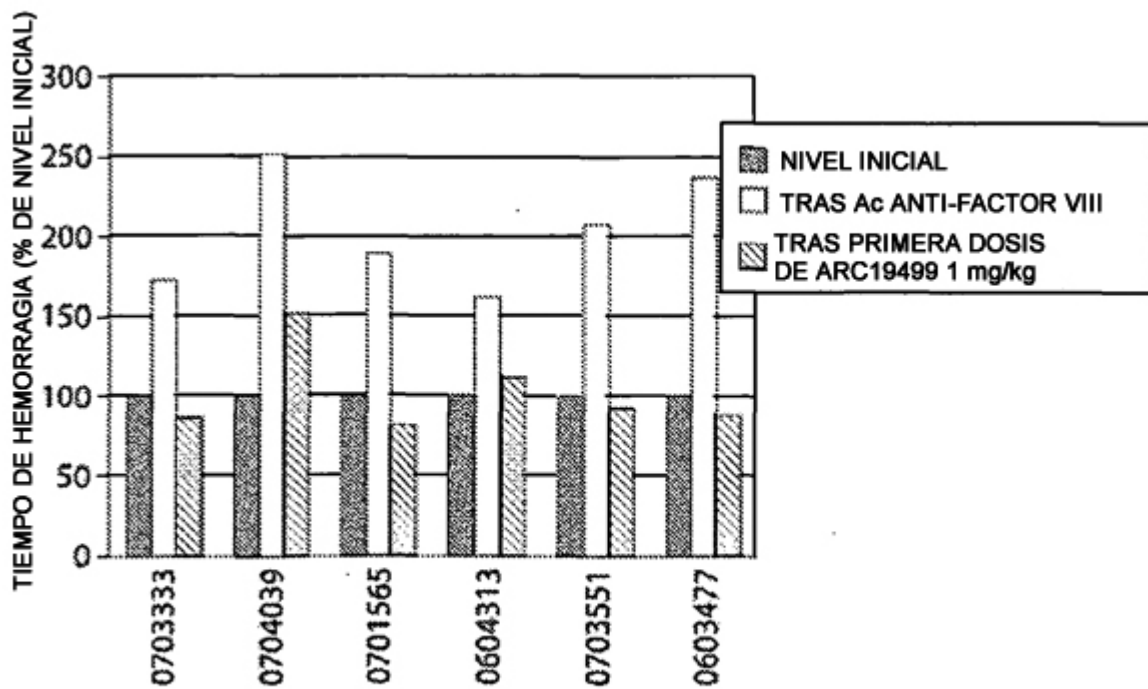


Fig. 123B

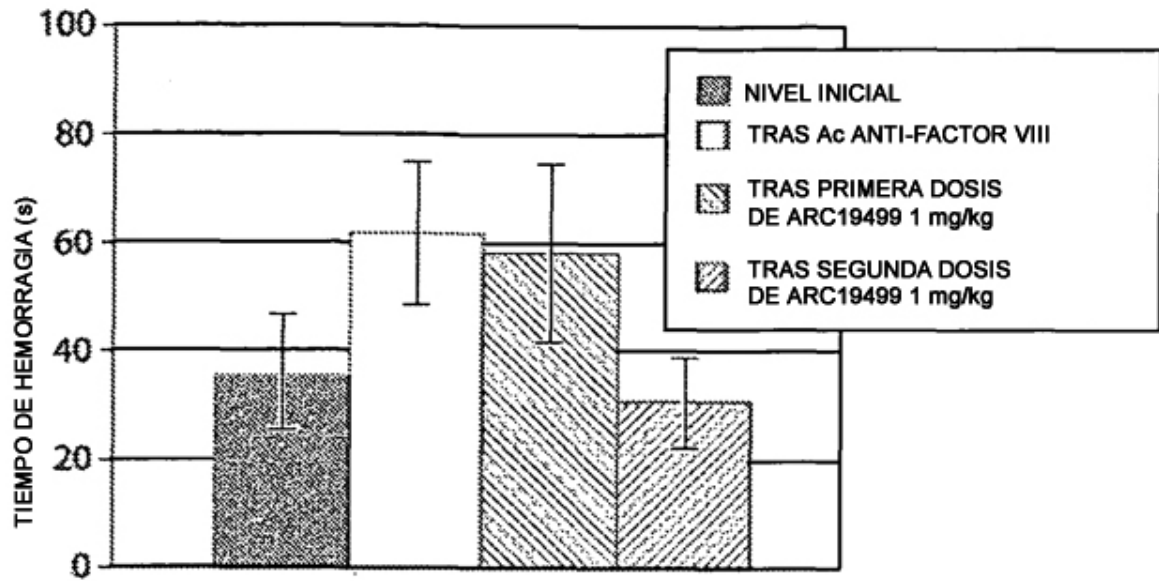


Fig. 124A

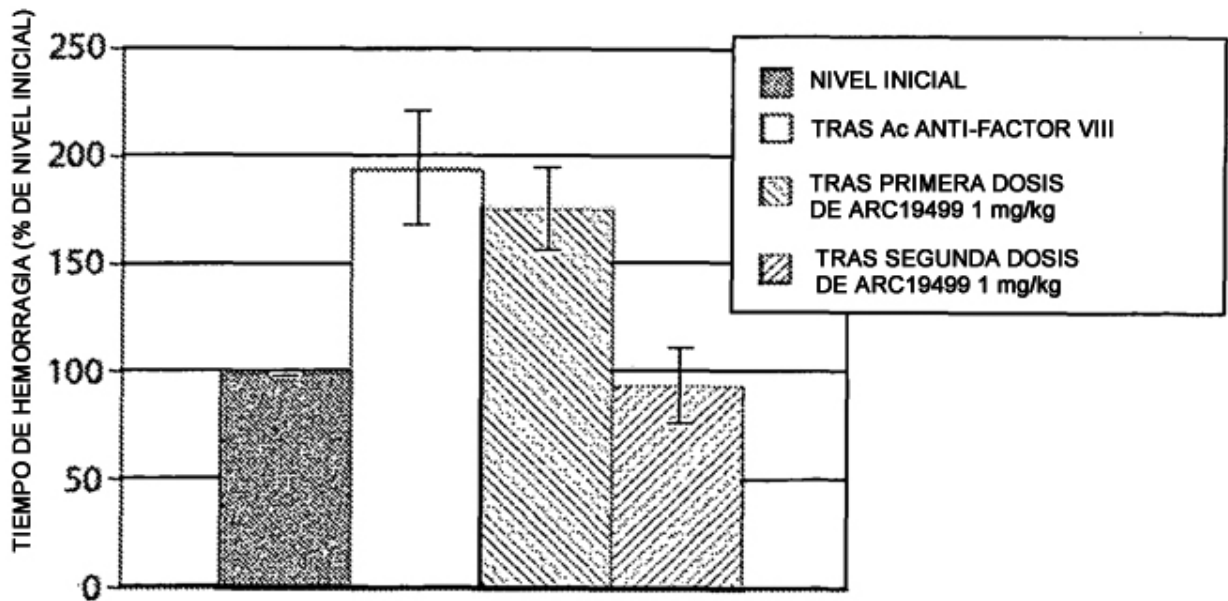


Fig. 124B

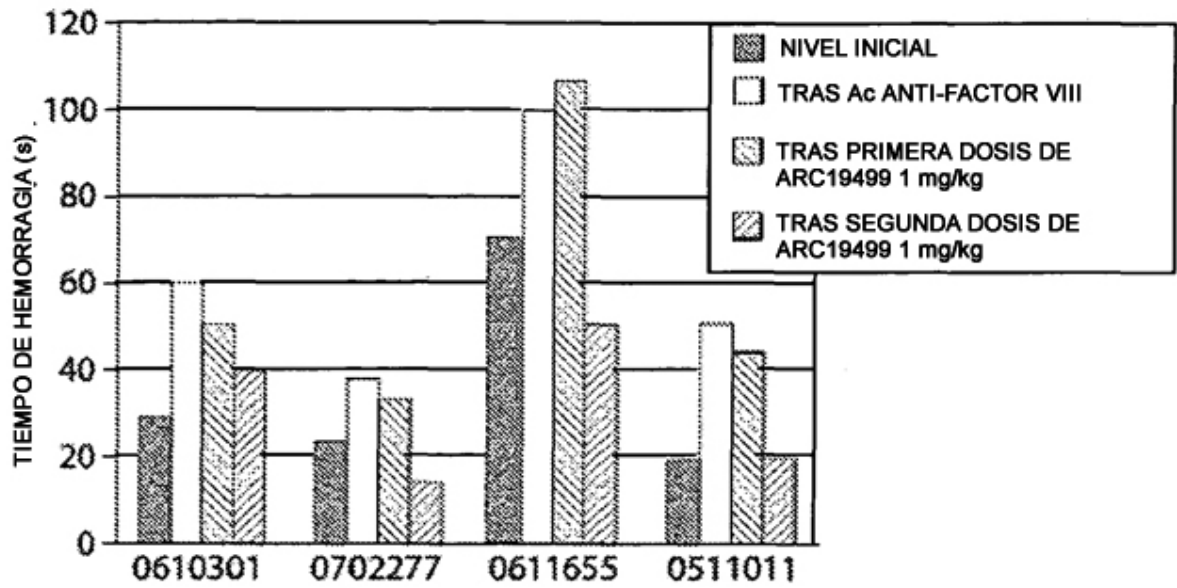


Fig. 125A

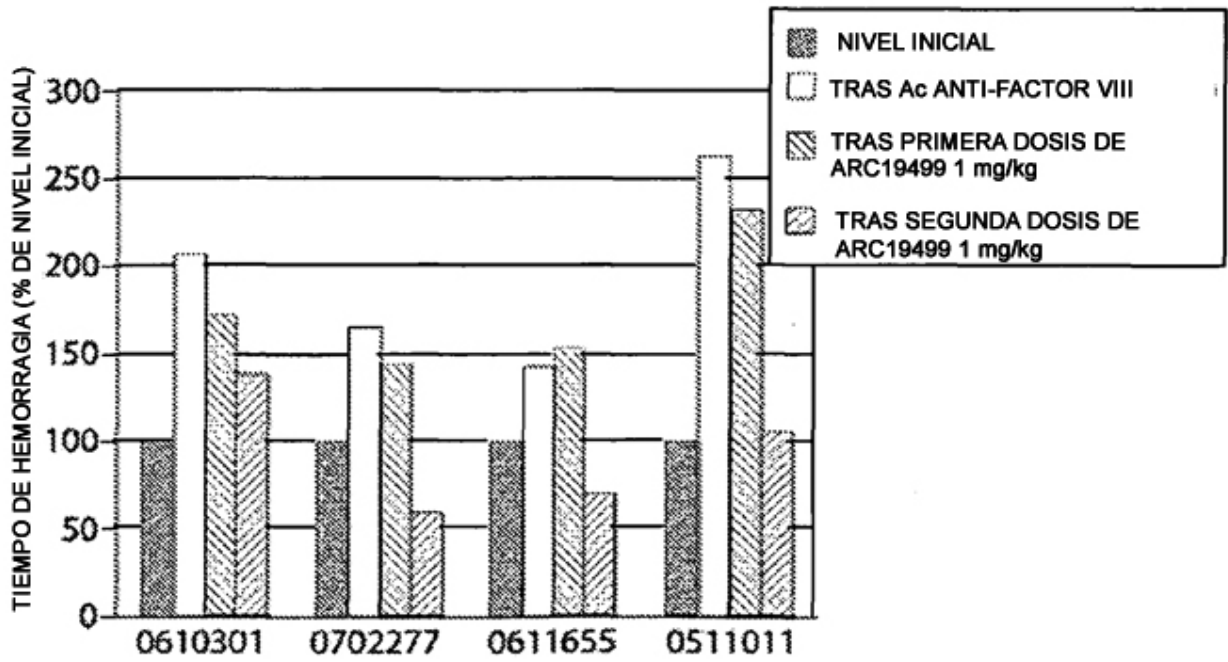


Fig. 125B

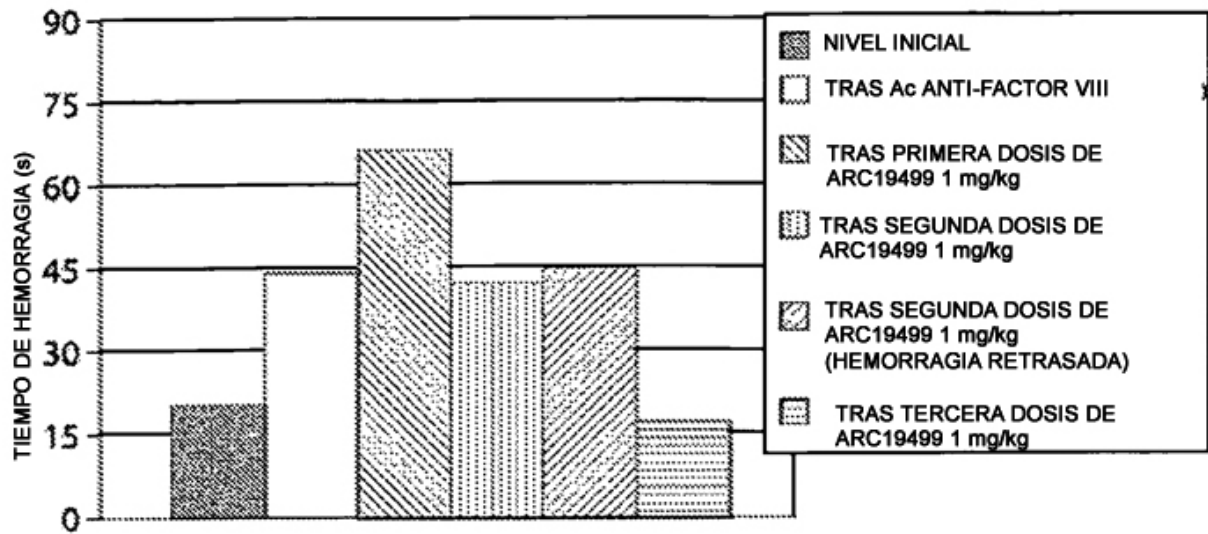


Fig. 126A

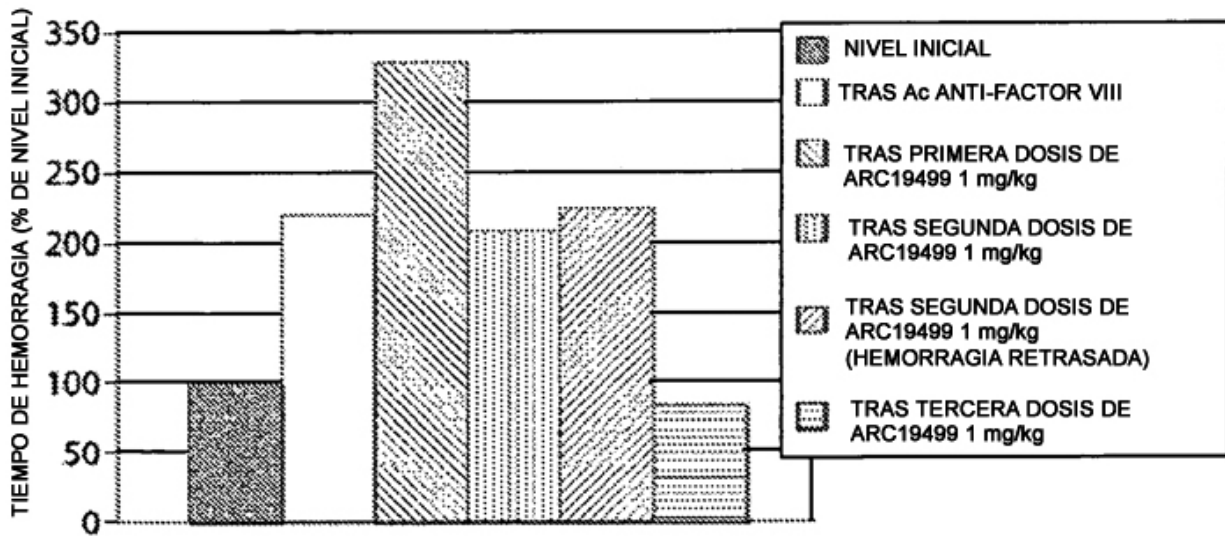


Fig. 126B

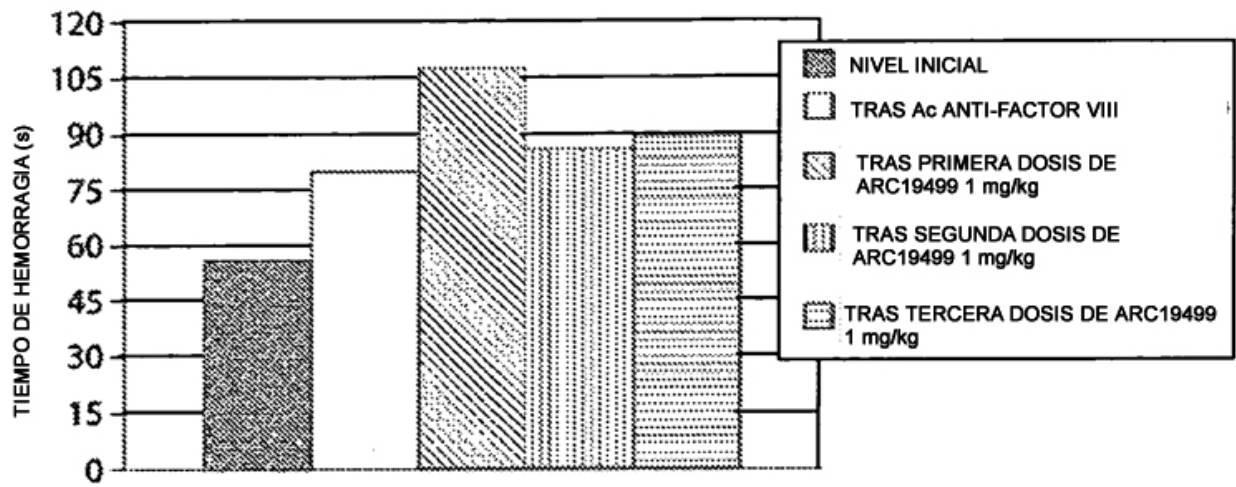


Fig. 127A

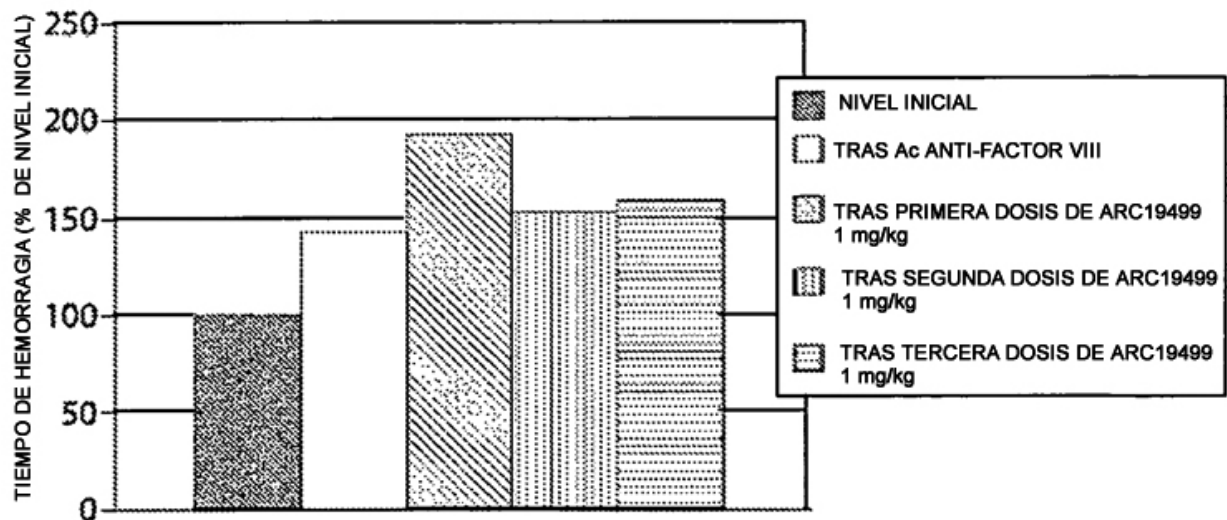


Fig. 127B

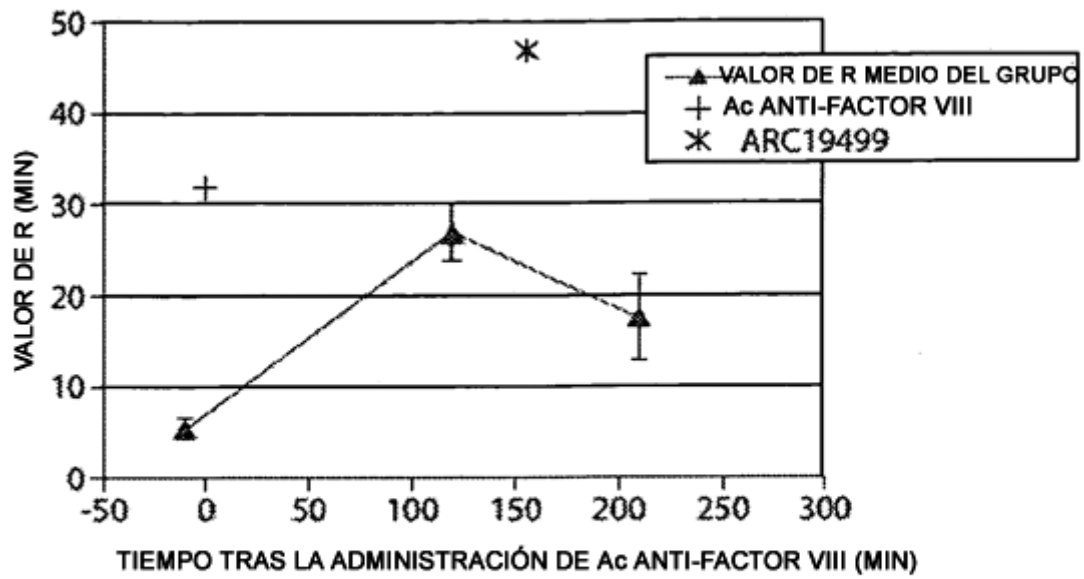


Fig. 128

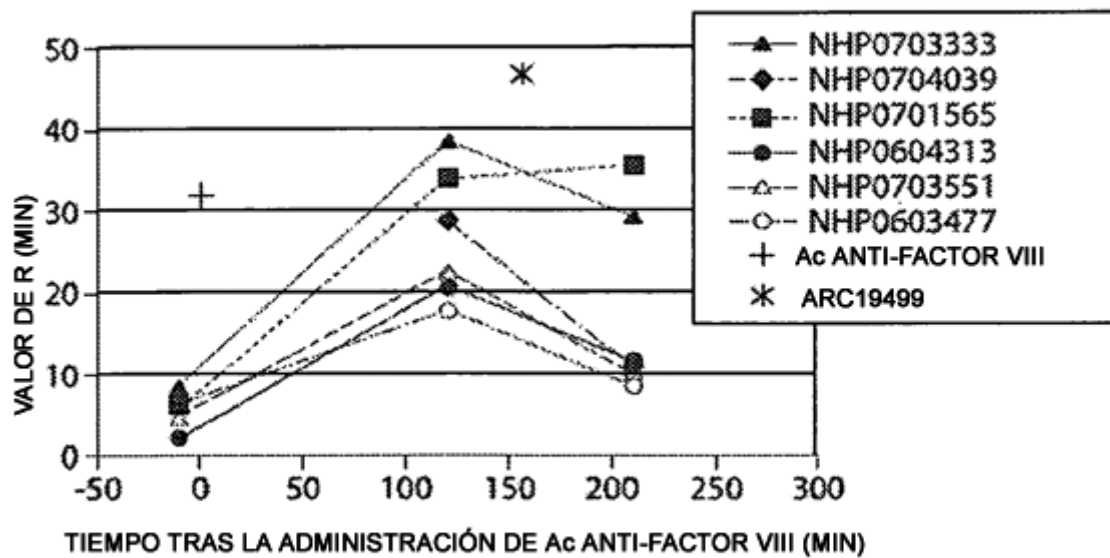


Fig. 129

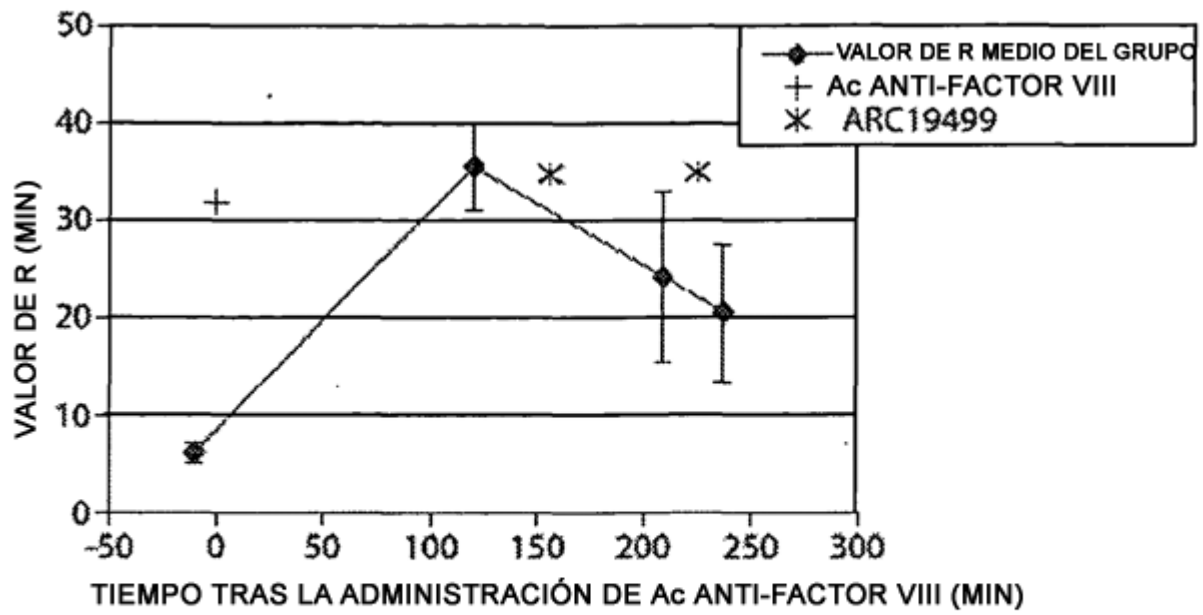


Fig. 130

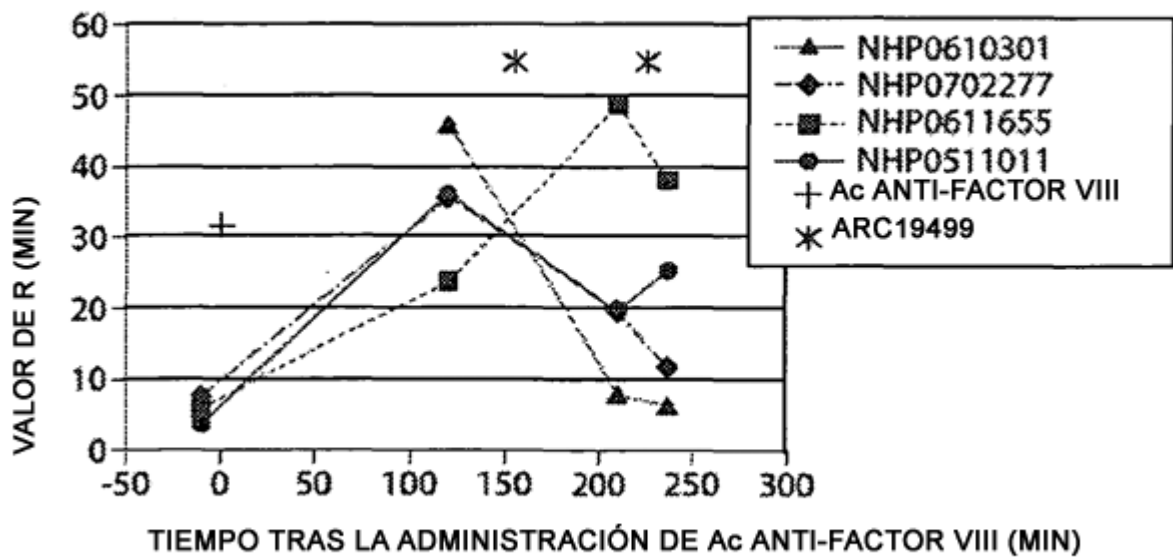


Fig. 131

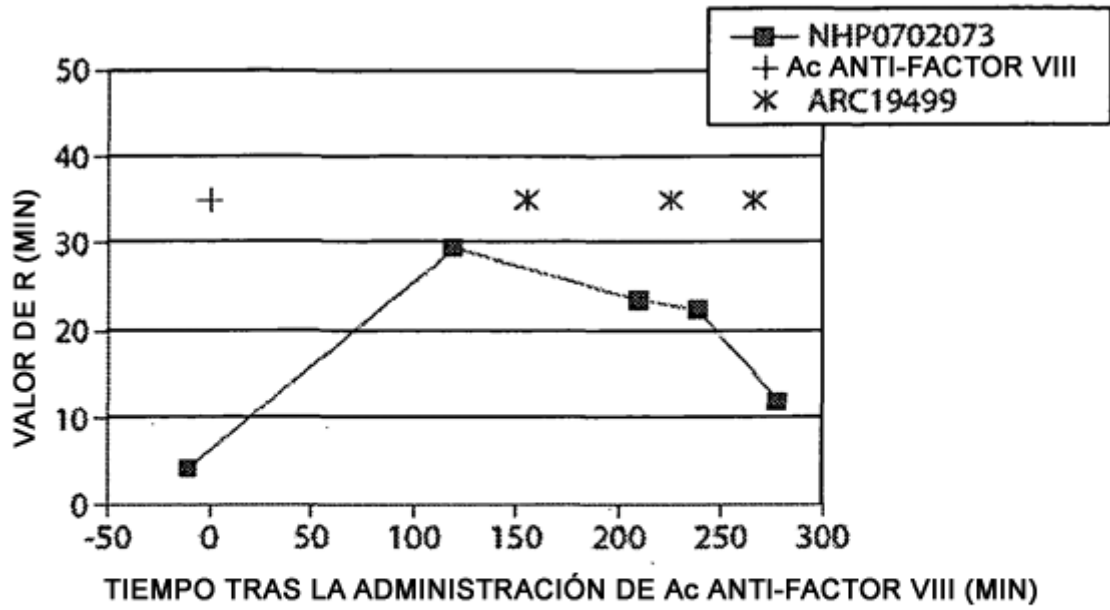


Fig. 132

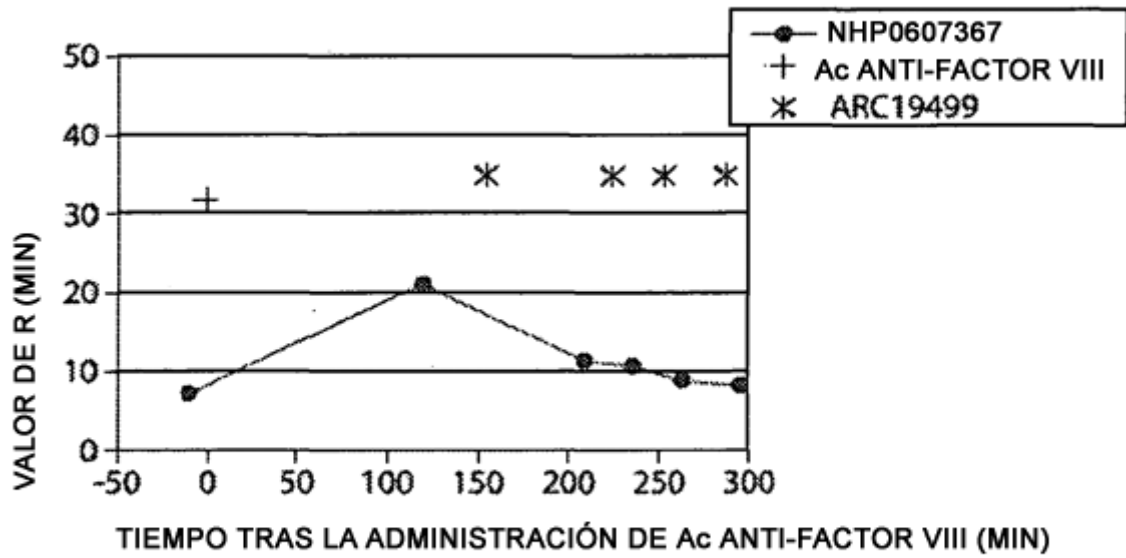


Fig. 133

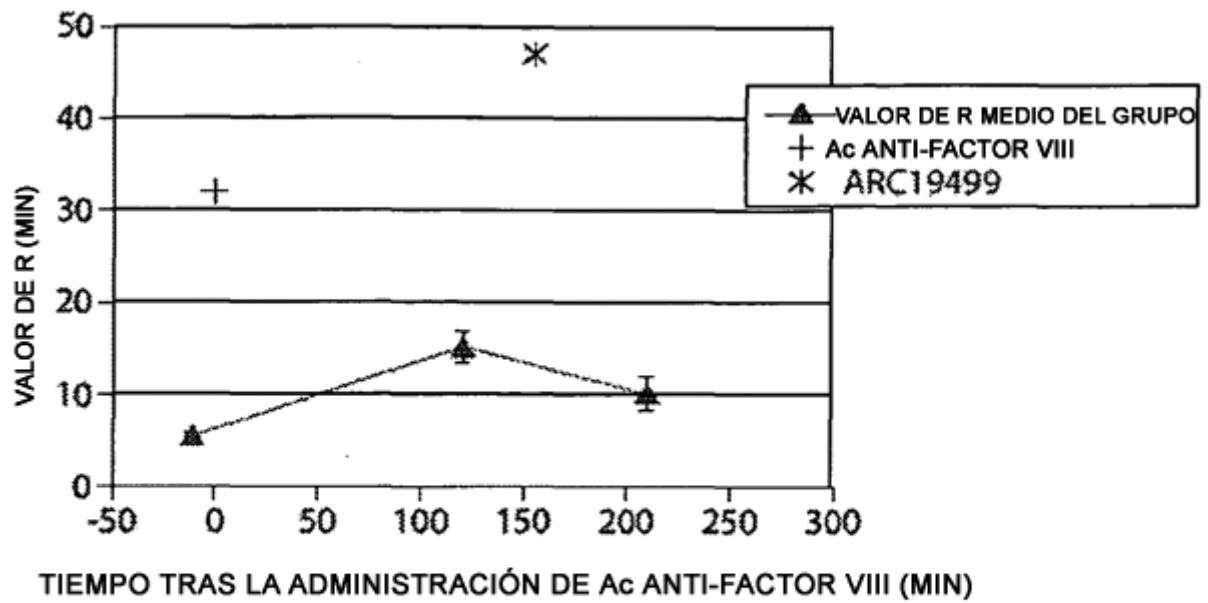


Fig. 134

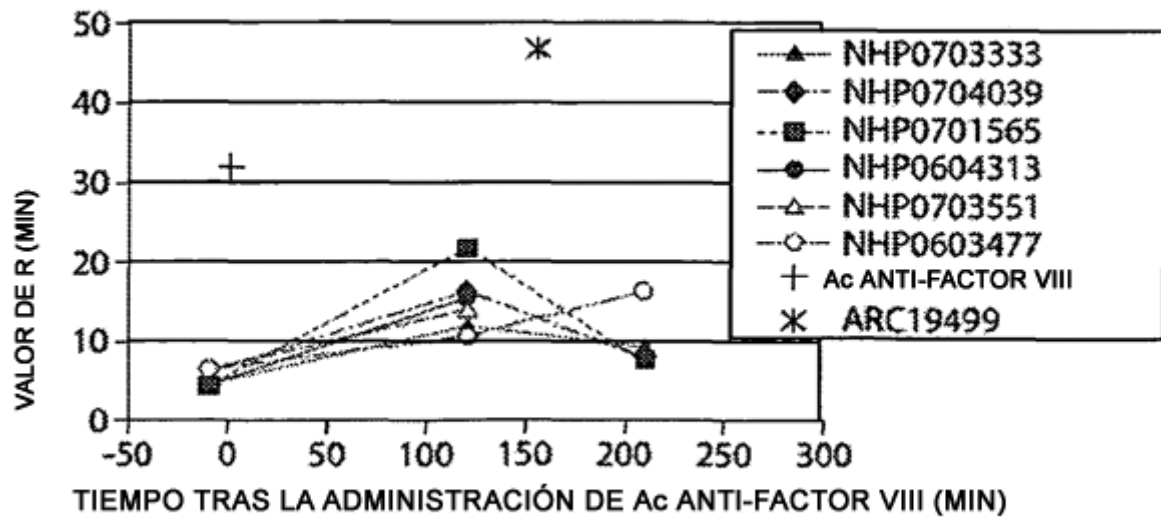


Fig. 135

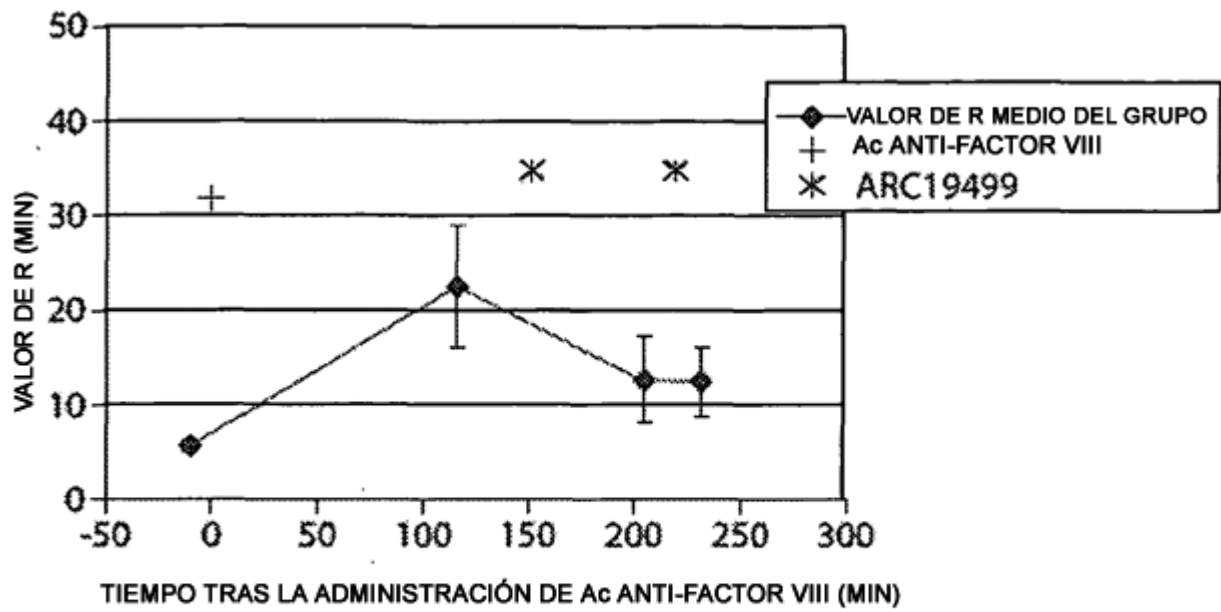


Fig. 136

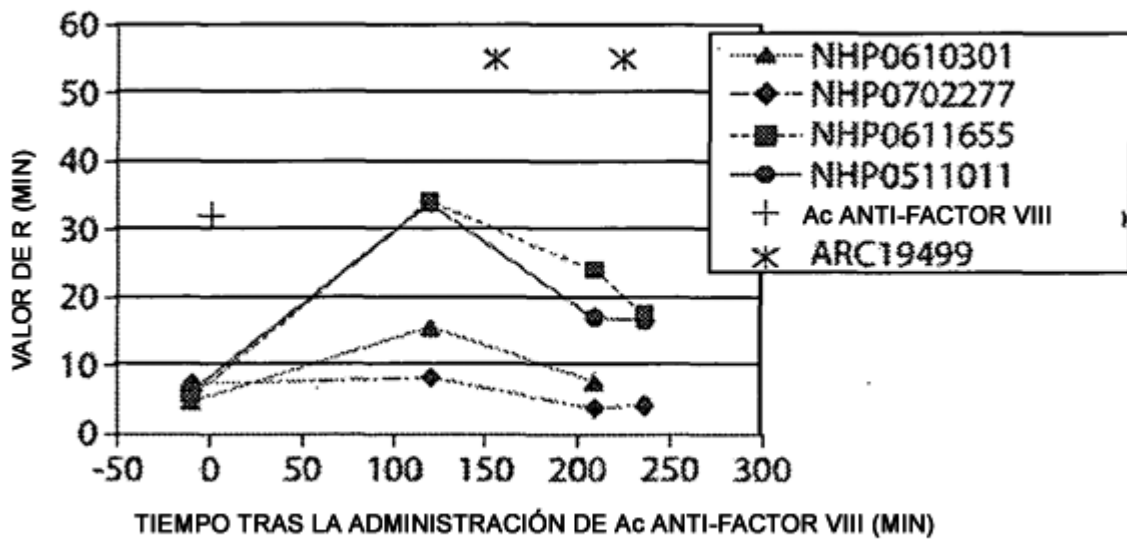


Fig. 137

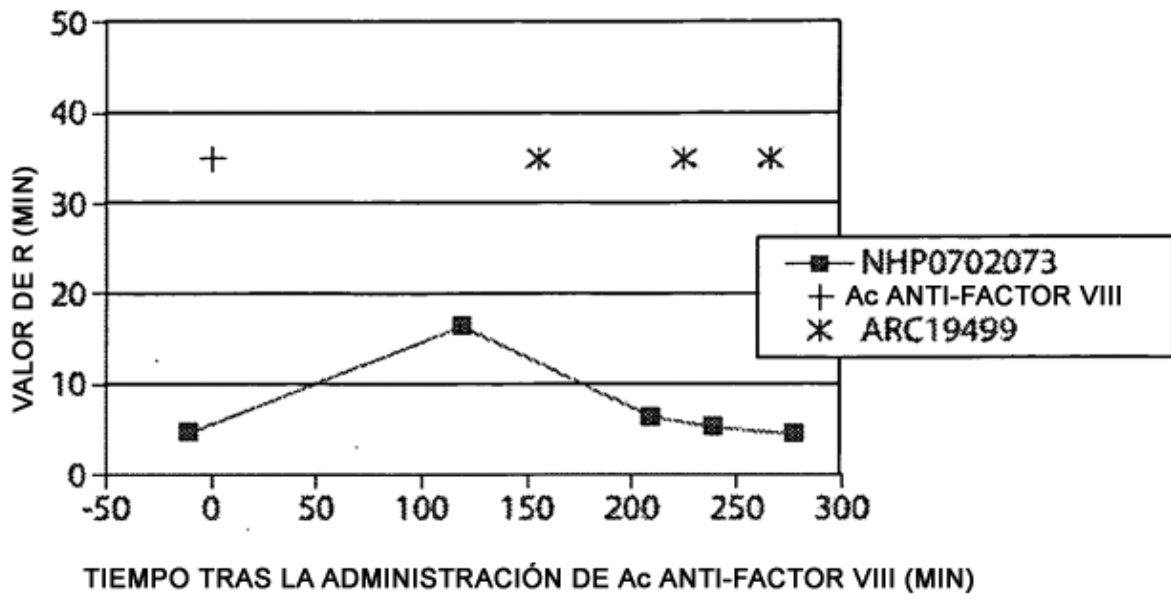


Fig. 138

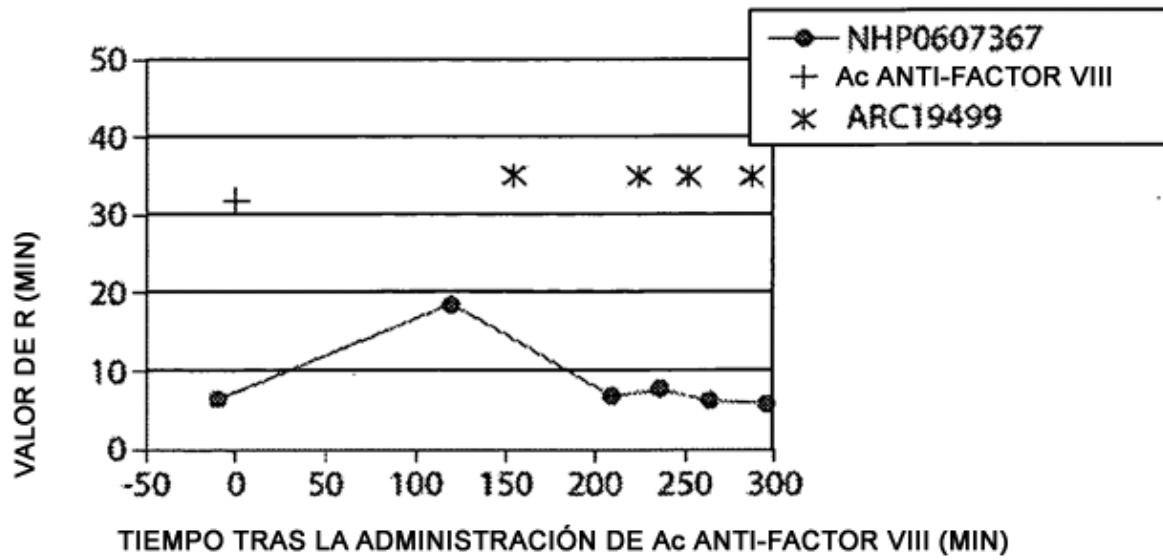


Fig. 139

\$EQID	RESIDUO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
2	ARC17460	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
19	ARC18538	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	mg	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
20	ARC18539	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	mg	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
21	ARC18540	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	mg	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
22	ARC18541	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	mg	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
23	ARC19493	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	mg	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
24	ARC19494	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	mg	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
25	ARC19495	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	mg	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
26	ARC19496	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	mg	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
27	ARC19448	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
28	ARC19449	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
29	ARC19450	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
30	ARC19451	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
31	ARC19452	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
32	ARC19453	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
33	ARC19454	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
34	ARC19455	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
35	ARC19456	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
36	ARC19457	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
37	ARC19458	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
38	ARC19459	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	mg	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
39	ARC19460	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
40	ARC19461	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
41	ARC19462	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
42	ARC19463	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
43	ARC19464	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
44	ARC19465	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T
45	ARC19466	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mA	mg	mg	mg	dC	mg	mU	mA	mU	mA	mU	mA	3T

Fig. 140-1

SEQ ID	RESIDUO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
46	ARC19467	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
47	ARC19468	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
48	ARC19469	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
49	ARC19470	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
50	ARC19471	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
51	ARC19472	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
52	ARC19473	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
53	ARC19474	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
54	ARC19475	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
55	ARC33867	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
56	ARC33868	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
57	ARC33869	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
58	ARC33870	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
59	ARC33871	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
60	ARC33872	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
61	ARC33873	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
62	ARC33874	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
63	ARC33875	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
64	ARC33876	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
65	ARC33877	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
66	ARC18545	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
67	ARC18546	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
68	ARC18549	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
69	ARC19476	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
70	ARC19477	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
71	ARC19478	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
72	ARC19484	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
73	ARC19490	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T
73	ARC19491	mg	mg	ma	ma	mu	ma	mu	ma	dc	mu	mu	mg	dc	mu	dc	mg	mu	mu	mu	ma	mg	mg	dc	mg	dc	mg	mu	ma	mu	ma	mu	ma	3T

Fig. 140-2

Fig. 141-1

SEQ ID	RESIDUO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
101	ARC17443	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mg	mg	mU	mg	dC	mg	mU	mA	smU	mA	mU	mA	3T
102	ARC17444	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mg	mg	mU	mg	dC	mg	mU	mA	smU	mA	mU	mA	3T
103	ARC19445	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mg	mg	mU	mg	dC	mg	mU	mA	smU	mA	mU	mA	3T
104	ARC19446	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mg	mg	mU	mg	dC	mg	mU	mA	smU	mA	mU	mA	3T
105	ARC19447	mg	mg	mA	mA	mU	mA	mU	mA	dC	mU	mU	mg	mg	dC	mU	dC	mg	mU	mU	mA	mg	mg	mU	mg	dC	mg	mU	mA	smU	mA	mU	mA	3T

Fig. 141-2

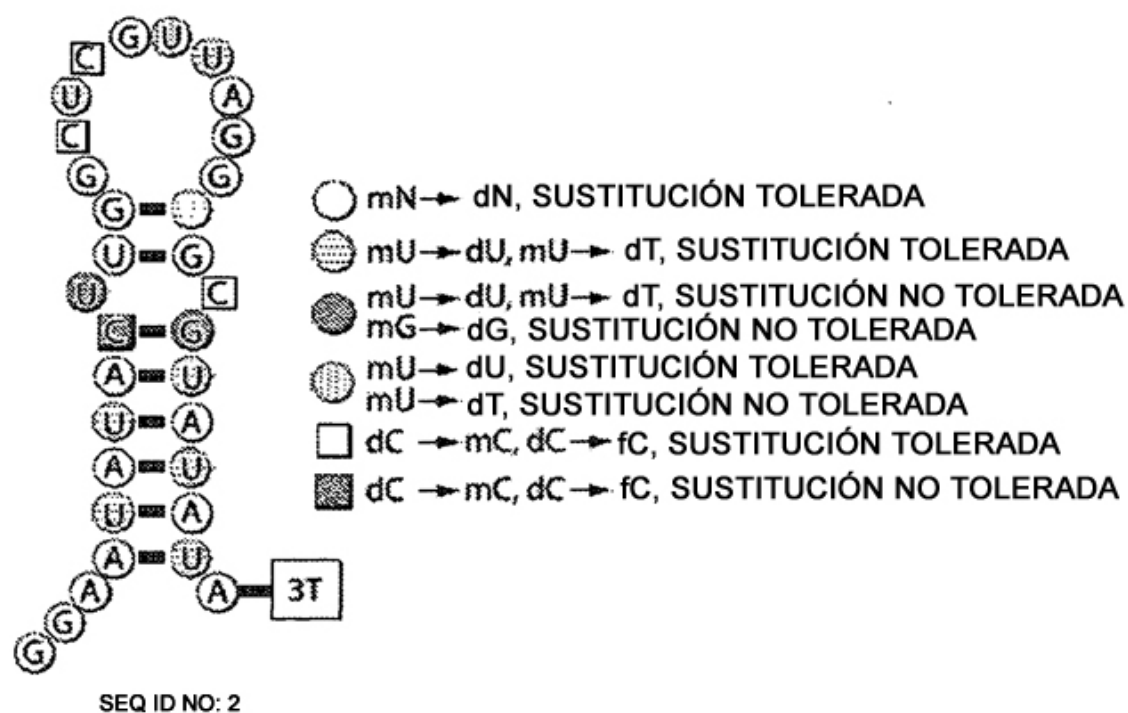


Fig. 142A

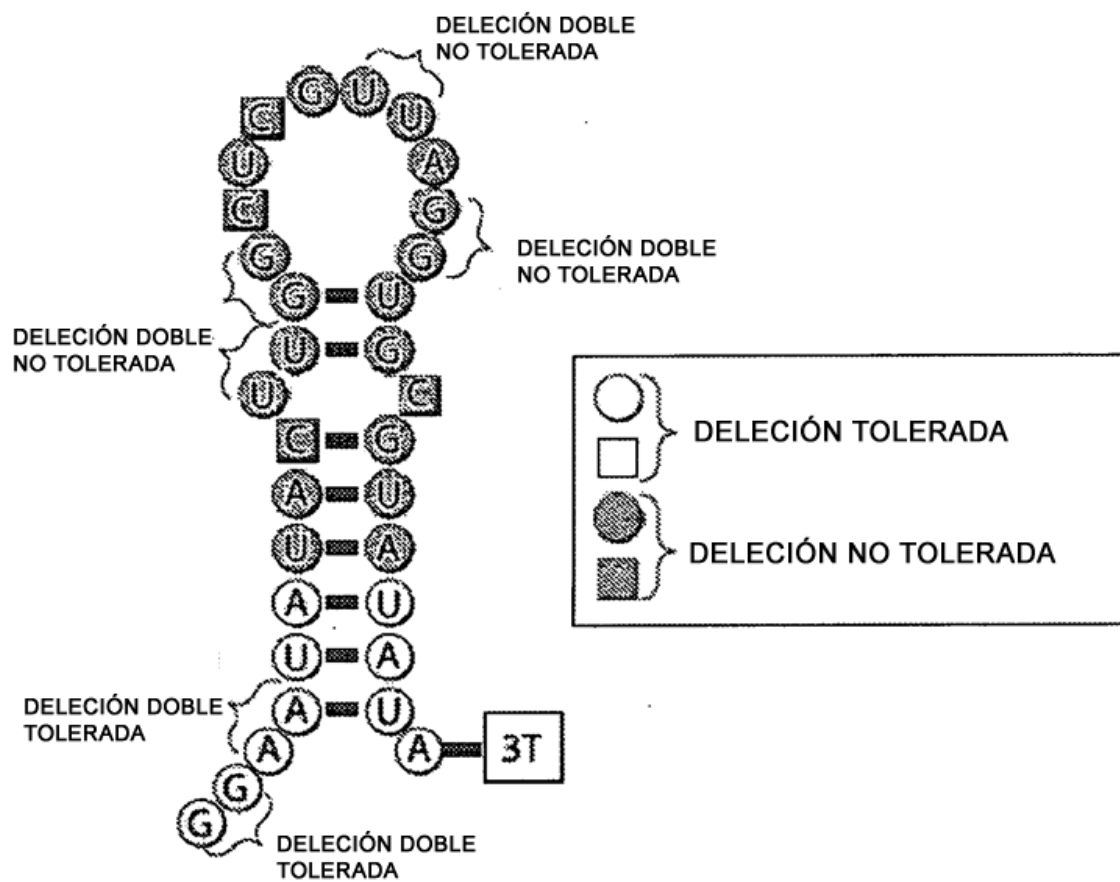
SEQ ID		RESIDUO 9	RESIDUO 14	RESIDUO 16	RESIDUO 25	¿TOLERADA?
2	ARC17480	dC	dC	dC	dC	SI
66	ARC18545	dC	mC	mC	dC	SI
8	ARC18546	dC	mC	dC	mC	SI
67	ARC18549	dC	mC	mC	mC	SI
68	ARC19476	fC	mC	dC	dC	SI
69	ARC19477	dC	mC	fC	dC	SI
70	ARC19478	dC	mC	dC	fC	SI
71	ARC19484	dC	fC	dC	mC	SI
72	ARC19490	fC	mC	dC	mC	SI
73	ARC19491	dC	mC	fC	mC	SI

Fig. 142B

Fig. 143-1

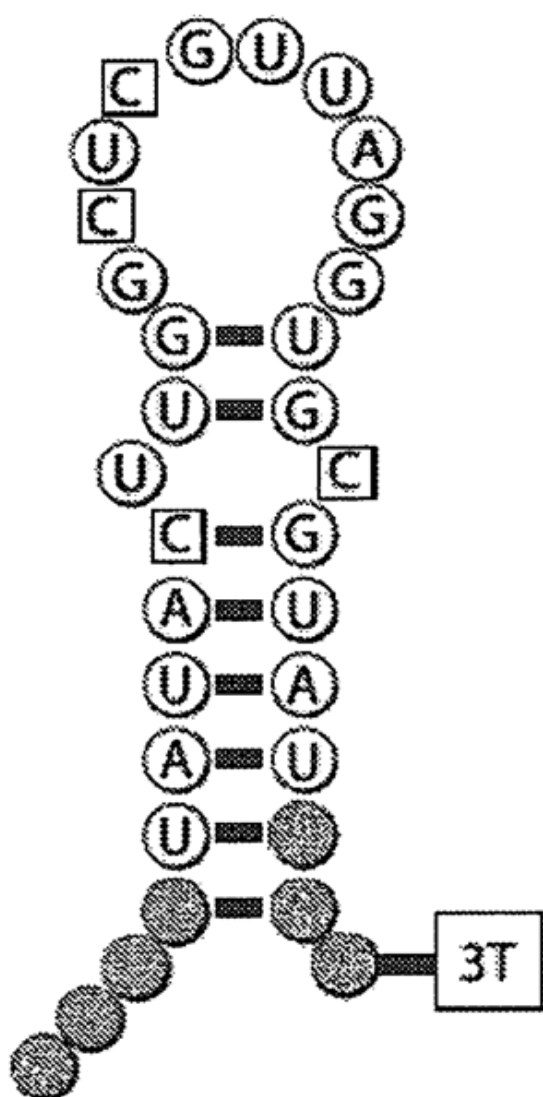
REQ ID	RESIDUO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
133	ARC33144	mg	mg			ml	ml	ml	ml	dc	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml
134	ARC33145	mg	mg	ml	ml	ml	ml	ml	dc	dc		mg	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml
135	ARC33146	mg	mg	ml	ml	ml	ml	ml	dc	ml	ml			dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml
136	ARC33147	mg	mg	ml	ml	ml	ml	ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml			ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml
137	ARC33148	mg	mg	ml	ml	ml	ml	ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml		ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml
138	ARC32303			ml	ml	ml	ml	ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml
139	ARC32305		mg	ml	ml	ml	ml	ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml
140	ARC32306			ml	ml	ml	ml	ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml
141	ARC32307				ml	ml	ml	ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml
142	ARC33889				ml	ml	ml	ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml
143	ARC33890			ml	ml	ml	ml	ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml
144	ARC33891				ml	ml	ml	ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml
145	ARC33895					ml	ml	ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml
146	ARC33900				ml			ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml
147	ARC33907	mg	mg	ml	ml			ml	dc	ml	ml	ml	mg	dc	ml	dc	mg	ml	ml	ml	ml	ml	mg	ml	mg	dc	mg	dc	mg	ml	ml	ml	ml

Fig. 143-2



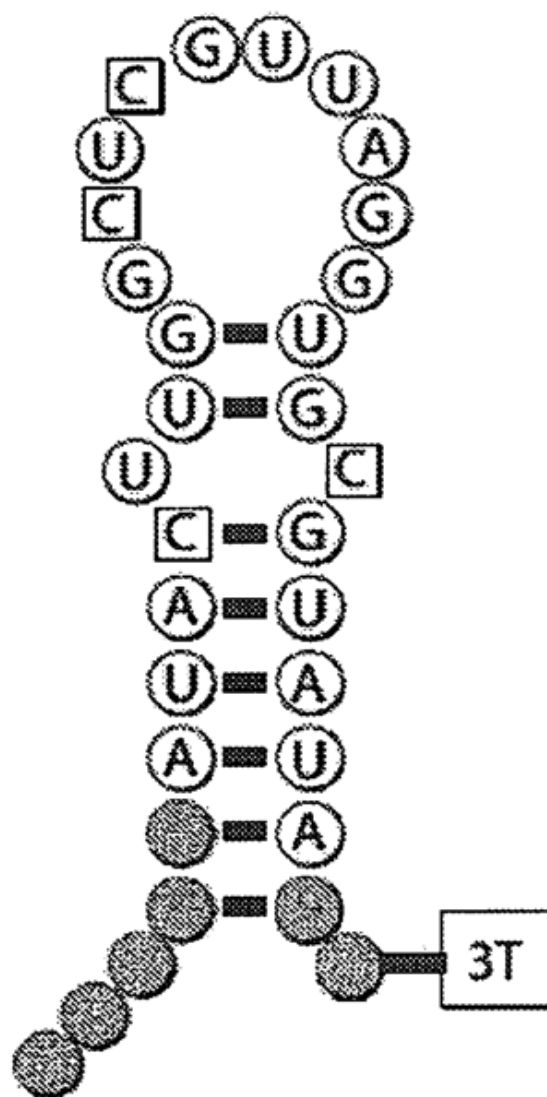
SEQ ID NO:2

Fig. 144A



ARC33889

SEQ ID NO: 142



ARC33895

SEQ ID NO: 145

Fig. 144B

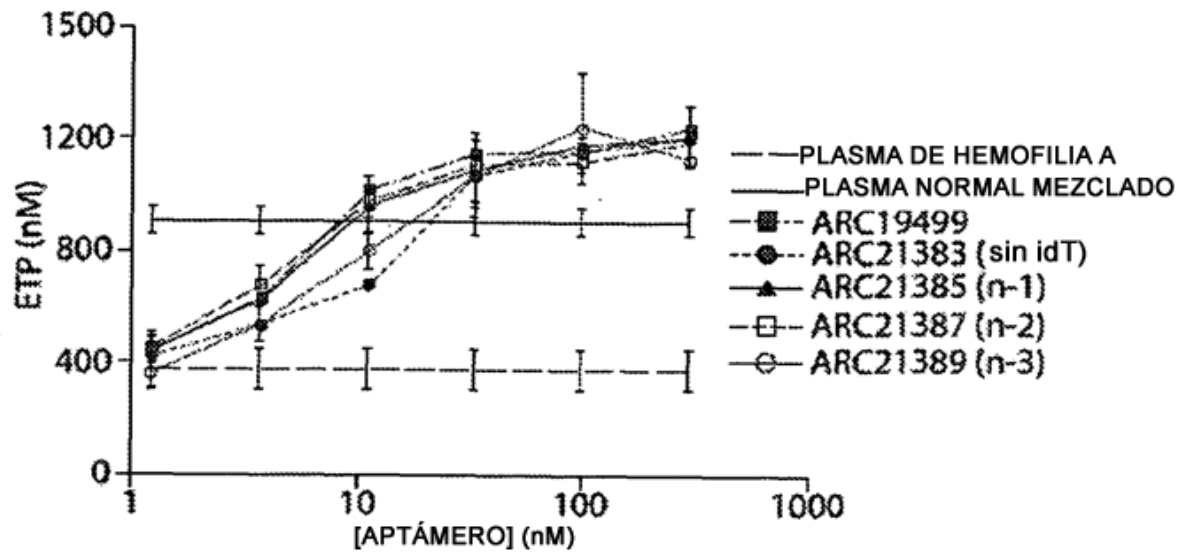


Fig. 145A

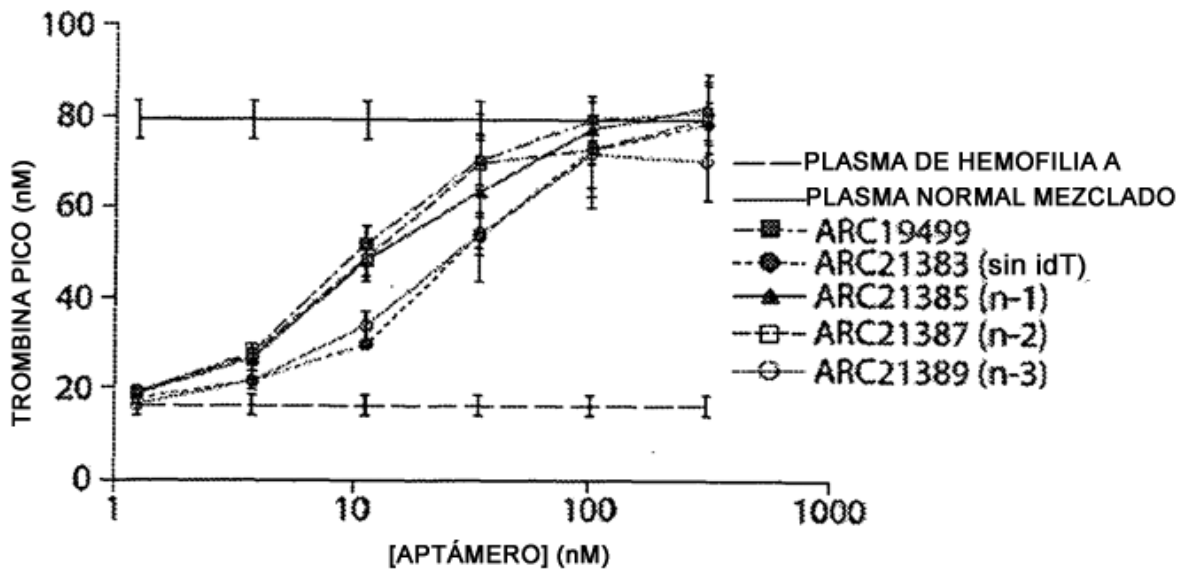


Fig. 145B