

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 179**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2015 PCT/US2015/033355**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15184372**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2015 E 15729302 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 3149173**

54 Título: **Compuestos de ácido nucleico para unión a una proteína de componente 3 del complemento**

30 Prioridad:

30.05.2014 US 201462005300 P

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

18.04.2018

73 Titular/es:

**SOMALOGIC, INC. (100.0%)
2945 Wilderness Place
Boulder, CO 80301, US**

72 Inventor/es:

**DROLET, DANIEL, W.;
ZHANG, CHI;
O'CONNELL, DANIEL, J. y
GUPTA, SHASHI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 664 179 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

Compuestos de ácido nucleico para unión a una proteína de componente 3 del complemento

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere de forma general al campo de ácidos nucleicos y, más específicamente, a aptámeros capaces de unirse al componente 3 del complemento humano (C3 o proteína C3), a composiciones que comprenden un aptámero de unión a C3 y C3 y a métodos de inhibición de la función biológica de C3 y métodos de
10 detección de C3 utilizando dichos aptámeros.

Antecedentes

El sistema del complemento comprende un grupo de proteínas que interaccionan entre sí que incluye proteínas solubles encontradas en la sangre y otros fluidos corporales, así como proteínas de unión a célula (Makrides, *Pharmacological Reviews* 1998, 50(1): 59-88). Este sistema desempeña un importante papel en la inmunidad innata que requiere el huésped para defenderse contra patógenos y media la lisis celular del patógeno, la quimiotaxis de célula inmune y fagocitosis (Janeway et al. *Immunobiology: The Immune System in Health y Disease*. 5ª edición. Nueva York: Garland Science; 2001.).

La proteína de componente 3 del complemento (C3) (una glucoproteína que se encuentra en la sangre) es un miembro de este sistema y desempeña un papel central en la ruta (Lambris, *Immunology Today* 1988, 9(12): 387-393). Los genes del componente 3 del complemento humano (C3) están localizados en el brazo corto del cromosoma 19 (Lusis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 1986, 83: 3929-3933) y se transcriben, procesan y traducen en pro-C3. Pro-C3 experimenta escisión endo-proteolítica específica de sitio tras la secreción para producir C3. C3 circula como una proteína que contiene dos subunidades (cadena alfa 115 kDa y cadena beta 75 kDa) unidas mediante un enlace disulfuro. La concentración de proteína C3 en el suero humano normal es aproximadamente 1,15 mg/ml (Kasperska-Zajac et al., *J. Inflammation* 2013, 10:22; doi: 10,1186/1476-9255-10-22).

Tras la activación, la unión covalente de proteína C3 a las superficies inicia muchos efectos del sistema del complemento. La activación puede tener lugar por proteólisis específica de sitio de proteína C3 soluble en dos proteínas denominadas C3a y C3b. C3b se une covalentemente a las superficies en las que actúa en partículas diana por fagocitosis (opsonización) o inicia la ruta del complemento terminal que conduce a la lisis celular del patógeno. C3a también denominada anafilotoxina, es un mediador de diversas funciones fisiológicas, como contracción de células del músculo liso, permeabilidad vascular, degranulación de mastocitos y quimiotaxis de células inmunes. Los inhibidores de C3 que impiden el evento de activación proteolítica específica de sitio son deseables, ya que pueden impedir las funciones biológicas tanto de C3a como C3b, así como la activación de la ruta del complemento terminal.

El sistema del complemento está rígidamente regulado por lo general para prevenir el daño del tejido en el huésped (Thurman et al., *J. Immunol.* 2006, 176: 1305-1310). Sin embargo, cuando se desregula, tal como puede ocurrir cuando falla uno o más de los mecanismos de control o por modulación del sistema inmune atípico, el exceso de activación del complemento resultante puede conducir a una patofisiología. Por ejemplo, tanto el síndrome hemolítico-urémico atípico como la degeneración macular relacionada con la edad tienen relación con las alteraciones en factor H de proteína de control del complemento que conducen a una mayor actividad de C3-convertasa y, por tanto, a un exceso de la activación del complemento (Ferreira et al., *Mol. Immunol.* 2010, 47(13): 2187-2197). La sobreactivación del complemento puede entonces atacar las propias células del huésped con el resultado del daño del tejido observado en estas enfermedades. El sistema del complemento puede contribuir también a daños del tejido causados por muchos trastornos inflamatorios y lesiones por isquemia/reperfusión. Por tanto, los agentes terapéuticos que pueden inhibir el sistema del complemento, incluyendo aquellos que inhiben la actividad de C3, pueden ser beneficiosos. La presente divulgación satisface estas necesidades al proporcionar aptámeros que pueden inhibir la bioactividad de la proteína C3 humana e impedir la liberación de C3a.

Determinar la concentración de C3 en los fluidos corporales es útil como prueba de diagnóstico para diversas enfermedades y afecciones, entre las que se incluyen, sin limitarse a ellas, el diagnóstico de estados inflamatorios agudos, infecciones microbianas, deficiencia de C3 congénita, glomerulonefritis aguda, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis membranoproliferativa y enfermedades por complejos inmunes (Nilsson et al., *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 2012: Article ID 962702, página 11). En el momento actual, los anticuerpos constituyen la herramienta más común para detectar C3. Sin embargo, presentan varias desventajas, incluyendo la estabilidad (tanto la tolerancia a diversas condiciones de temperatura y pH como la falta de capacidad de recuperación desde condiciones no ideales), lo que equivale a un período de validez limitado, requisitos de almacenamiento especiales (p.ej., refrigeración), agregación y producción relativamente costosa. La presente divulgación aborda estos problemas relacionados con los anticuerpos proporcionando aptámeros que tienen una especificidad de unión a una proteína C3 humana.

65

Mallik et al (Ácidos nucleicos Research, Vol. 28, No.7, 1 abril 2010, páginas e93-e93 & Datos suplementarios) divulga un aptámero bi-funcional que se une a una proteína fluorescente verde y C3b/iC3b.

La patente internacional WO97/42317 A1 divulga aptámeros que se unen a la proteína del complemento C3b.

Sumario

La presente divulgación describe aptámeros capaces de unirse a la proteína de componente 3 (C3) del complemento humano; se ha demostrado que estos aptámeros son inhibidores de la activación mediada por complemento de C3 y que, por tanto, pueden ser útiles como agentes de diagnóstico y terapéuticos. Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden aptámeros que se unen a una proteína C3 y métodos para su uso y preparación.

En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a una proteína C3. En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende la secuencia 5'-KPGRMPDVD_nLPAWPSVGPAYRPP-3' (SEQ ID NO: 152), en la que K es una pirimidina modificada en C-5, C, U, T, G o un espaciador de 3 carbonos; cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; R es A o G; M es C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos; cada D es independientemente, y cada vez que aparece, A, C o un espaciador de 3 carbonos; cada V es independientemente, y cada vez que aparece, A, G, C o un espaciador de 3 carbonos; L es A, U, T o una pirimidina modificada en C-5; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; Y es C, U o T; y n es 0 o 1. En algunas realizaciones, el aptámero comprende la secuencia 5'- KPGRMPDVD_nLPAWPSVGPAYRPPM-3' (SEQ ID NO: 153), en la que cada M es independientemente, y cada vez que aparece, C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos.

En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a una proteína C3. En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende la secuencia 5'-KPGRMPDVD_nLPAWPSVGPACGPP-3' (SEQ ID NO: 131), en la que K es una pirimidina modificada en C-5, C, U, T, G o un espaciador de 3 carbonos; cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; R es A o G; M es C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos; cada D es independientemente, y cada vez que aparece, A, C o un espaciador de 3 carbonos; cada V es independientemente, y cada vez que aparece, A, G, C o un espaciador de 3 carbonos; L es A, U, T o una pirimidina modificada en C-5; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; y n es 0 o 1. En algunas realizaciones, el aptámero comprende la secuencia 5'- KPGRMPDVD_nLPAWPSVGPACGPPM-3' (SEQ ID NO: 135), en la que cada M es independientemente, y cada vez que aparece, C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos.

En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende la secuencia 5'-KPGRMPXPAWPSVGPAYRPP-3' (SEQ ID NO: 154), en la que K es una pirimidina modificada en C-5, C, U, T, G o un espaciador de 3 carbonos; cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; R es A o G; M es C, U, T una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos; V es A, G, C o un espaciador de 3 carbonos; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; Y es C, U o T; y X es un engarce seleccionado entre un engarce de C₂-C₂₀ sustituido o sin sustituir, un alquilen glicol y un polialquilen glicol. En algunas realizaciones, el aptámero comprende la secuencia 5'-KPGRMPXPAWPSVGPAYRPPM-3' (SEQ ID NO: 155), en la que cada M es independientemente, y cada vez que aparece, C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos.

En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende la secuencia 5'-KPGRMPXPAWPSVGPACGPP-3' (SEQ ID NO: 136), en la que K es una pirimidina modificada en C-5, C, U, T, G o un espaciador de 3 carbonos; cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; R es A o G; M es C, U, T una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos; V es A, G, C o un espaciador de 3 carbonos; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; y X es un engarce seleccionado entre un engarce de C₂-C₂₀ sustituido o sin sustituir, un alquilen glicol y un polialquilen glicol. En algunas realizaciones, el aptámero comprende la secuencia 5'- KPGRMPXPAWPSVGPACGPPM - 3' (SEQ ID NO: 137), en la que cada M es independientemente, y cada vez que aparece, C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos.

En cualquiera de las realizaciones descritas, K puede ser una pirimidina modificada en C-5, C o G; cada M puede ser independientemente, y cada vez que aparece, C o una pirimidina modificada en C-5; y/o L puede ser A o pirimidina modificada en C-5.

En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende la secuencia 5'-PAWPSVGPAYRPP-3' (SEQ ID NO: 156), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; V es A, G o C; Y es C, U o T; y R es G o A.

En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende la secuencia 5'-PAWPSVGPACGPP

-3' (SEQ ID NO: 134), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; y V es A, G o C.

5 En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende una secuencia que es idéntica al menos en un 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 % o 100 % a una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 4 a 130 y 138 a 151, en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5. En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende una secuencia que es idéntica en al menos un 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 % o 100 % a una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 4 a 28, 32 a 34, 37 a 10 75, 78 a 118, 121 a 130 y 139 a 151, en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5.

15 En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende una primera región y una segunda región, en las que la primera región comprende la secuencia 5'-PAGPC-3' (SEQ ID NO: 132) y la segunda región comprende la secuencia 5'-GPAYRPP-3' (SEQ ID NO: 156), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; Y es C, U o T; y R es G o A.

20 En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende una primera región y una segunda región, en las que la primera región comprende la secuencia 5'-PAGPC-3' (SEQ ID NO: 132) y la segunda región comprende la secuencia 5'-GPACGPP-3' (SEQ ID NO: 133), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5.

25 En algunas realizaciones, el extremo 3' de la primera región está covalentemente unido al extremo 5' de la segunda región. En algunas realizaciones, la primera región y la segunda región están unidas covalentemente mediante al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco engarces, en los que cada uno de los engarces se selecciona independientemente entre un nucleótido, un engarce de C₂-C₂₀ sustituido o sin sustituir, un alquilen glicol y un polialquilen glicol. En algunas realizaciones, cada engarce se selecciona independientemente entre un nucleótido, un espaciador de 3 carbonos y a hexaetilen glicol.

30 En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende la secuencia 5'-PAGPC-3' (SEQ ID NO: 132), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5. En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende la secuencia 5'-GPACGPP-3' (SEQ ID NO: 133), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5. En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende la secuencia 5'-GPAYRPP-3' (SEQ ID NO: 156), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; Y es C, U o T; y R es G o A.

40 En algunas realizaciones, un aptámero que se une a una proteína C3 comprende la secuencia SEQ ID NO: 125, en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5.

45 En algunas realizaciones de los aptámeros descritos en el presente documento, cada pirimidina modificada en C-5 se selecciona independientemente entre: 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-fenilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (PEdU), 5-(N-tiofenilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ThdU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-tirosilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TyrdU), 5-(N-3,4-metilendioxi-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (MBndU), 5-(N-4-fluorobencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (FBndU), 5-(N-3-fenilpropilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (PPdU), 5-(N-imidazoliletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ImdU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-R-treoninilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ThrdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NapdU), 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NEdU), 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NEdU), 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BFdU), 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BTdU), 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina y 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina. En algunas realizaciones, cada pirimidina modificada en C-5 se selecciona independientemente entre: 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NapdU), 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NEdU), 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NEdU), 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BTdU), 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina y 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina.

5 fluorouridina, 5-(N-3-benzofuraniletílcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BFdU), 5-(N-3-benzofuraniletílcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-3-benzofuraniletílcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzotiofeniletílcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BTdU), 5-(N-3-benzotiofeniletílcarboxiamida)-2'-O-metiluridina y 5-(N-3-benzotiofeniletílcarboxiamida)-2'-fluorouridina. En algunas realizaciones, cada pirimidina modificada en C-5 es 5-(N-naftilmetílcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU).

En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el aptámero puede comprender al menos un nucleótido modificado con 2'-O-metilo.

10 En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el aptámero puede ser de aproximadamente 24 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 28 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 28 nucleótidos de longitud. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el aptámero puede ser de 24 a 100 nucleótidos de longitud o de 30 a 60 nucleótidos de longitud o de 28 a 60 nucleótidos de longitud o de 28 a 50 nucleótidos de longitud o de 28 a 40 nucleótidos de longitud o de 40 a 50 nucleótidos de longitud o de 28 a 32 nucleótidos de longitud.

20 En algunas realizaciones, un aptámero descrito en el presente documento se une a una proteína C3 e inhibe la escisión de proteína C3. En algunas realizaciones, la proteína C3 es proteína C3 humana.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición, que comprende un aptámero descrito en el presente documento y una proteína de componente 3 (C3) del complemento. En algunas de dichas realizaciones, la proteína de componente 3 (C3) del complemento es una proteína de componente 3 (C3) del complemento humana.

25 En algunas realizaciones, se divulgan métodos para inhibir la escisión de una proteína de componente 3 (C3) del complemento, que comprenden el contacto de una proteína C3 con un aptámero descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la proteína C3 está en una muestra *in vitro*. En algunas realizaciones, la proteína C3 está en un sujeto.

30 En algunas realizaciones, se divulgan métodos para inhibir al menos una actividad del sistema del complemento, que comprenden el contacto de componentes del sistema del complemento con un aptámero descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, los componentes del sistema del complemento están en una muestra *in vitro*. En algunas realizaciones, los componentes del sistema del complemento están en un sujeto.

35 En algunas realizaciones, se divulgan métodos para inhibir la escisión de una proteína de componente 3 (C3) del complemento en un sujeto, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un aptámero descrito en el presente documento.

40 En algunas realizaciones, se divulgan métodos para inhibir al menos una actividad del sistema del complemento en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un aptámero descrito en el presente documento.

45 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad, una enfermedad autoinmune, un trastorno hematológico, una enfermedad infecciosa, septicemia, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad neurodegenerativa, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un aptámero, tal como se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmune se selecciona entre lupus eritematoso y artritis reumatoide. En algunas realizaciones, el trastorno hematológico es hemoglobinuria paroxismal nocturna. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria se selecciona entre lesión por isquemia/reperfusión, artritis y nefritis. En algunas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson.

50 En algunas realizaciones, se divulga el uso de un aptámero descrito en el presente documento para inhibir la escisión de proteína C3. En algunas realizaciones, se divulga el uso de un aptámero descrito en el presente documento para inhibir al menos una actividad del sistema del complemento. En algunas realizaciones, se divulga un aptámero descrito en el presente documento para tratar degeneración macular relacionada con la edad, una enfermedad autoinmune, un trastorno hematológico, una enfermedad infecciosa, septicemia, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad neurodegenerativa. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmune se selecciona entre lupus eritematoso y artritis reumatoide. En algunas realizaciones, el trastorno hematológico es hemoglobinuria paroxismal nocturna. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria se selecciona entre lesión por isquemia/reperfusión, artritis y nefritis. En algunas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson.

55 En algunas realizaciones, se divulgan métodos para seleccionar un aptámero que tiene afinidad de unión con la proteína C3. En algunas realizaciones, un método comprende: (a) contacto de una mezcla candidato con una proteína C3, en el que la mezcla candidato comprende ácidos nucleicos modificados en los que una, varias o todas las pirimidinas en al menos uno o cada uno de los ácidos nucleicos de la mezcla candidato comprende una

pirimidina modificada en C-5; (b) exposición de la mezcla candidato a un proceso de enriquecimiento de constante de disociación lenta, en el que los ácidos nucleicos que tienen una velocidad de disociación lenta desde la molécula diana en relación con otros ácidos nucleicos en la mezcla candidato se unen con la proteína C3 formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) división de los ácidos nucleicos de constante de disociación lenta de la mezcla candidato; y (d) amplificación de los ácidos nucleicos de constante de disociación lenta para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse a la proteína C3 con una constante de disociación lenta, en virtud de lo cual se selecciona un aptámero de constante de disociación lenta para la molécula de proteína C3. En algunas realizaciones, la mezcla candidato comprende ácidos nucleicos que comprenden la secuencia 5'- PAGPC -3' (SEQ ID NO: 132), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5. En algunas realizaciones, la mezcla candidato comprende ácidos nucleicos que comprenden la secuencia 5'- GPACGPP -3' (SEQ ID NO: 133), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5. En algunas realizaciones, la mezcla candidato comprende ácidos nucleicos que comprenden la secuencia 5'- GPAYRPP -3' (SEQ ID NO: 156), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; Y es C, U o T; y R es G o A. En algunas realizaciones, cada ácido nucleico es independientemente de aproximadamente 24 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 28 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud o aproximadamente 28 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, cada pirimidina modificada en C-5 se selecciona independientemente entre: 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-fenilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (PEdU), 5-(N-tiofenilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ThdU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-tirosilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TyrdU), 5-(N-3,4-metilendioxbencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (MBndU), 5-(N-4-fluorobencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (FBndU), 5-(N-3-fenilpropilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (PPdU), 5-(N-imidizoliletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ImdU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-R-treoninilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ThrdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio) propil] carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)] carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NapdU), 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-1-naftiletilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NEdU), 5-(N-1-naftiletilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftiletilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftiletilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NEdU), 5-(N-2-naftiletilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftiletilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BFdU), 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BTdU), 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina y 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina. En algunas realizaciones, cada pirimidina modificada en C-5 se selecciona independientemente entre: 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NapdU), 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-1-naftiletilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NEdU), 5-(N-1-naftiletilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftiletilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftiletilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NEdU), 5-(N-2-naftiletilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftiletilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BFdU), 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BTdU), 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina y 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina. En algunas realizaciones, cada pirimidina modificada en C-5 es 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU). En algunas realizaciones, una pluralidad de ácidos nucleicos en la mezcla comprende al menos un nucleótido modificado con 2'-O-metilo. En algunas realizaciones, una pluralidad de ácidos nucleicos en la mezcla comprende un espaciador de C3, un engarce HEG o un engarce PEG. En algunas realizaciones, la proteína C3 es una proteína C3 humana.

Los objetivos, características y ventajas de la invención que se han expuesto se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada, en la que se hace referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A y 1B. (A) Se muestran las veinticinco secuencias de aptámero de patrón 1 activas y derivadas independientemente. Se muestra el número de veces que se secuenció aptámero idéntico o equivalente (≤ 5 diferencias de nucleótido) de la agrupación de la Ronda 9 con respecto a 40.00 secuencias. Se resaltan los nucleótidos idénticos al aptámero secuenciado con más frecuencia del patrón 1, 8491-3_3 dentro de cada secuencia. (B) En las dos filas de arriba se muestra la posición de nucleótido y la secuencia de consenso para el patrón 1 del aptámero. Las filas A, C, G y P (en las que A es adenina, C es citosina y G es guanina, P es un NapdU) indican la frecuencia con la que se observan estos nucleótidos en el patrón 1 de aptámero en cada una de las 23 posiciones de nucleótido que definen las secuencias de consenso. En la secuencia de consenso,

múltiples consensos de nucleótido se indican con el siguiente código de una sola letra. R = A o G; M = P o C, K = C, G o P; L = A o P; D = C o A; V = A, C o G. Se permite la inserción de una sola base entre las posiciones 8 y 9. La inserción tiene lugar con una frecuencia de 0,16. La frecuencia de "no inserción" fue 0,84.

Figura 2. Muestra una representación gráfica de la fracción de moléculas de ADN unidas (eje de las y) representada en el gráfico en función de la concentración de proteína (eje de las x). La concentración de proteína C3 humana osciló entre 1×10^{-7} M y 1×10^{-12} M y se calcularon las constantes de unión en equilibrio (K_d) aplicando $y = \text{máximo} - \text{mínimo} / (K_d + P_i) + \text{mínimo}$. Los aptámeros 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5), 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58) y 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125) se unieron a C3 con una K_d de $3,13 \times 10^{-11}$ M, $3,34 \times 10^{-11}$ M y $5,49 \times 10^{-11}$ M, respectivamente.

Figura 3. Muestra una representación gráfica de la fracción de moléculas de ADN unidas (eje de las y) representadas en el gráfico en función de la concentración de proteína humana C5 de control (eje de las x). La concentración de proteína C5 osciló entre 1×10^{-7} M y 1×10^{-12} M. No se detectó la unión discernible de 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58) o 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125) con proteína C5 humana.

Figura 4. Las secuencias de patrón 1 inhiben la hemólisis mediada por complemento de glóbulos rojos de oveja revestidos con anticuerpo en suero humano. Se llevaron a cabo los experimentos, tal como se describe en el Ejemplo 3 utilizando proteína C3 humana 25 nM y 1 μ M del aptámero indicado. Cada barra despliega la mediana del porcentaje de hemólisis de dos experimentos independientes en relación con el "control sin inhibidor". El control de la osmolisis presenta el porcentaje de absorbancia relativo a 412 nm cuando se lisan todos los glóbulos rojos. Las barras de error indican el intervalo de los dos experimentos. aptámeros sin unión 8491-94_14 (SEQ ID NO: 35); 8491-94_15 (SEQ ID NO: 36); 8491-398_3 (SEQ ID NO: 30) y 8491-401_3 (SEQ ID NO: 29) inhibieron la lisis en menos de un 25 %. aptámeros de unión a proteína C3 8491-3_3 (SEQ ID NO: 4); 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5); 8491-189_3 (SEQ ID NO: 8); 8491-282_3 (SEQ ID NO: 9); 8491-387_3 (SEQ ID NO: 16); 8491-388_3 (SEQ ID NO: 18); 8491-389_3 (SEQ ID NO: 6); 8491-390_3 (SEQ ID NO: 7); 8491-393_3 (SEQ ID NO: 14); 8491-394_3 (SEQ ID NO: 11); 8491-395_3 (SEQ ID NO: 10); 8491-396_3 (SEQ ID NO: 13); 8491-397_3 (SEQ ID NO: 12); 8491-399_3 (SEQ ID NO: 27); 8491-400_3 (SEQ ID NO: 24); 8491-405_3 (SEQ ID NO: 17); 8491-406_3 (SEQ ID NO: 15) y 8491-409_3 (SEQ ID NO: 28) inhibieron la lisis en más de un 50 %.

Figura 5A y 5B. Inhibición de hemólisis mediada por complemento de glóbulos rojos de oveja revestidos con anticuerpo en suero humano por 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5) y sus derivados. Se llevaron a cabo los experimentos, tal como se describe en el Ejemplo 3, utilizando varias concentraciones de aptámeros, tal como se muestra en la figura, con una concentración fija (20 nM) de proteína C3 humana. Se ajustan los datos a una ecuación logística de 4 parámetros para determinar la IC_{50} . Panel (A) muestra que 8491-94_3 inhibe con una IC_{50} de 14,8 nM mientras que 8491-94_26 (SEQ ID NO: 54), 8491-94_27 (SEQ ID NO: 55), 8491-94_30 (SEQ ID NO: 60), 8491-94_36 (SEQ ID NO: 66), 8491_94_37 (SEQ ID NO: 67) y 8491-94_43 (SEQ ID NO: 73) inhiben con valores IC_{50} de 15,1 nM, 24,6 nM, 20,9 nM, 25,0 nM, 24,7 nM y 19,2 nM, respectivamente. Panel (B) muestra que el aptámero, 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58), inhibe con una IC_{50} de 17,1 nM mientras que los aptámeros 8491-94_90 (SEQ ID NO: 118), 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125) y 8491-94_100 (SEQ ID NO: 128) inhiben con valores IC_{50} de 18,9 nM, 15,6 nM y 19,7 nM, respectivamente.

Figura 6. Inhibición de liberación de C3a (en suero humano normal al 34 %) mediante 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5), 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58) y 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125) tras la activación con complemento inducida por cimosano-A. Se llevaron a cabo experimentos tal como se describe en el Ejemplo 4. Se ajustan los datos a una ecuación logística de 4 parámetros para determinar los valores IC_{50} de 2 μ M, 1,5 μ M y 3 μ M para 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5), 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58) y 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125), respectivamente.

Figura 7A y 7B. Se digirieron aptámeros 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58), 8491-94_90 (SEQ ID NO: 118), 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125), 8491-94_100 (SEQ ID NO: 128) y 8491-94_102 (SEQ ID NO: 130) (250 nM) a 37 °C durante el número de horas indicado con 0,002 unidades/ μ l ADNasa I (A) tal como se describe en el Ejemplo 5 y se separaron los productos de digestión por electroforesis con gel de poliacrilamida. Se visualizaron las bandas con oro SYBR. Se muestra el tamaño de los aptámeros de longitud completa (FL) y de marcadores de longitud molecular seleccionados en los que N es el número de nucleósidos. (B) El porcentaje que queda de cada banda de aptámero de longitud completa (SOMAmero) frente al tiempo, tal como se determina por densiometría. El prefijo "OH" indica un término 5' sin modificar.

Figura 8A y 8B. Se digirieron aptámeros 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58), 8491-94_90 (SEQ ID NO: 118), 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125), 8491-94_100 (SEQ ID NO: 128) y 8491-94_102 (SEQ ID NO: 130) a 37 °C durante el número de horas indicado con 0,014 unidades/ μ l ADNasa II tal como se describe en el Ejemplo 5 y se separaron los productos de digestión por electroforesis con gel de poliacrilamida. Se separaron los productos de digestión por electroforesis con gel de poliacrilamida. Se visualizaron las bandas con oro SYBR. Se muestra el tamaño de los aptámeros de longitud completa (FL) y de marcadores de longitud molecular seleccionados en los que N es el número de nucleósidos. (B) El porcentaje que queda de cada banda de aptámero de longitud completa (SOMAmero) frente al tiempo, tal como se determina por densiometría. El prefijo "OH" indica un término 5' sin modificar.

Figura 9 muestra ciertos ejemplos de pirimidina modificada en C-5 (o modificaciones 5-dU), tal como se explica en el Ejemplo 15. Cada estructura de modificación está unida a dU tal como se muestra, p.ej., en la Figura 10.

Figura 10 muestra ciertas modificaciones de pirimidina C-5 y cadena principal, tal como se explica en la sección de los Ejemplos.

Figura 11 muestra ciertos ejemplos de pirimidina modificada (o pirimidina modificada en C-5) que puede ser incorporada en aptámeros, como por ejemplo aptámeros de constante de disociación lenta. La Figura 11 proporciona las definiciones para R', R" y R'''.

Figura 12A y 12B. (A) Inhibición de liberación de C3a en suero humano normal al 10 % mediante SOMAmeros de patrón 1 8491-3_3 (SEQ ID NO: 4), 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5), 8491-189_3 (SEQ ID NO: 8), 8491-387_3 (SEQ ID NO: 16) y 8491-389_3 (SEQ ID NO: 6) tras la activación del complemento inducida con cimosano-A. La concentración de aptámero fue 2 μ M y el experimento fue realizado tal como se describe en el Ejemplo 4. Se presentan los datos como porcentaje de la señal obtenida del control sin inhibidor. (B) Experimento de control que demuestra que 8491-3_3 (SEQ ID NO: 4), (8491-94_3 (SEQ ID NO: 5), 8491-189_3 (SEQ ID NO: 8), 8491-387_3 (SEQ ID NO: 16) y 8491-389_3 (SEQ ID NO: 6) no interfieren materialmente con el ensayo para la liberación de C3a. Se presentan los datos como el porcentaje de la señal obtenida a partir del control sin inhibidor.

Descripción detallada

I. Términos y Métodos

A no ser que se señale de otra forma, los términos técnicos se utilizan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology y Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona la siguiente explicación de los términos específicos:

aptámero: El término aptámero, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico de origen no natural que tiene una acción deseable en una molécula diana. Las acciones deseables incluyen, pero sin limitarse a ellas, unión de la diana, inhibición de la actividad de la diana, potenciación de la actividad de la diana, alteración de las propiedades de unión de la diana (como por ejemplo aumento o disminución de la afinidad de la diana para un ligando, receptor, cofactor, etc.), inhibición del procesamiento de la diana (como por ejemplo inhibición de la escisión con proteasa de una proteína diana), potenciación del procesamiento de la diana (como el aumento de la velocidad o el grado de escisión con proteasa de una proteína diana) e inhibición o facilitación de la reacción entre la diana y otra molécula. Un aptámero puede referirse también a un "ligando de ácido nucleico". En algunas realizaciones, un aptámero es un SOMAmero. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aptámero" incluye aptámeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, a no ser que se indique de otra forma específicamente.

En algunas realizaciones, un aptámero se une específicamente a una molécula diana, en la que la molécula diana es una estructura química tridimensional distinta a un polinucleótido que se une al aptámero a través de un mecanismo que es independiente del apareamiento de bases de Watson/Crick o la formación de triple hélice y en el que el aptámero no es un ácido nucleico que tiene la función fisiológica conocida de unirse a través de la molécula diana. En algunas realizaciones, los aptámeros para una diana determinada incluyen ácidos nucleicos identificados a partir de una mezcla candidato de ácidos nucleicos, según un método que comprende: (a) contacto de la mezcla candidato con la diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad con la diana en relación con otros ácidos nucleicos de la mezcla candidato se pueden dividir del resto de la mezcla candidato; (b) división de los ácidos nucleicos de mayor afinidad desde el resto de la mezcla candidato y (c) amplificación de los ácidos nucleicos de mayor afinidad para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando, en virtud de lo cual se identifican los aptámeros para la molécula diana. Se reconoce que las interacciones de afinidad son cuestión de grado; sin embargo, en este contexto, un aptámero que se "une específicamente" a su diana significa que el aptámero se une a su diana con un grado de afinidad mucho mayor que con el que se une a otros componentes no diana en la mezcla o la muestra. Un "aptámero" o "ligando de ácido nucleico" es un grupo de copias de un tipo o especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos en particular. Un aptámero puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos. "Aptámeros" se refiere a más de un conjunto de moléculas. Los diferentes aptámeros pueden tener el mismo número de nucleótidos o un número diferente de nucleótidos. Los aptámeros pueden comprender ADN, ARN, tanto ADN como ARN, y versiones modificadas de cualquiera de ellos o ambos y pueden ser monocatenarios, bicatenarios o pueden contener regiones bicatenarias o tricatenarias u otras estructuras tridimensionales.

Bioactividad: El término bioactividad, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más procesos intercelulares, intracelulares o extracelulares (p.ej., unión célula-célula, unión ligando-receptor, señalización de célula, etc.) que puede tener impacto en los procesos fisiológicos o patofisiológicos.

Pirimidina modificada en C-5: pirimidina modificada en C-5, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una pirimidina con una modificación en la posición C-5. Entre los ejemplos de pirimidina modificada en C-5 se incluyen las descritas en las patentes estadounidenses No. 5.719.273 y 5.945.527. En el presente documento se proporcionan ciertos ejemplos no exhaustivos de pirimidina modificada en C-5.

Aptámero C3: "aptámero C3", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un aptámero que es capaz de unirse a una proteína C3.

Espaciador C3: A "espaciador C3" o "espaciador de 3 carbonos" o "sustitución C3", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un engarce que comprende al menos tres carbonos diseñados para extenderse la misma distancia que el nucleótido, pero que carecen de una fracción azúcar ribosa y purina o base pirimidina. En algunas realizaciones, un espaciador C3 tiene la estructura $(CH_2)_3$, en al que está covalentemente unido con los nucleótidos adyacentes u otras fracciones a través de enlaces fosfodiéster o fosforotioato.

Componentes del sistema del complemento: Componentes del sistema del complemento, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere una o más de las proteínas que funcionan en la ruta del complemento y que son capaces de iniciar, activar, promover y/o modular la ruta del complemento. Por lo tanto, en el contexto de un reactivo (p.ej., aptámero), que es capaz de inhibir o inhibir sustancialmente el sistema del complemento como resultado del contacto de una muestra que comprende los componentes del sistema del complemento, el reactivo puede por ejemplo interactuar, unirse y/o interferir con la actividad, unión y/o función de una o más de las proteínas en la ruta del complemento.

Inhibir: El término inhibir, tal como se utiliza en el presente documento, significa reducir la actividad biológica de una diana en un grado en el que la diana pierda una cantidad cuantificable de actividad; o reducir la estabilidad y/o reducir la actividad de una diana hasta un grado en el que la diana deja de tener una actividad cuantificable. En otras realizaciones, dicha inhibición puede producirse porque se afecte la interacción de la diana con otra fracción y/o se afecte el procesamiento de la diana. Tal como se describe en el presente documento, la diana que puede inhibirse es C3.

Modificado: Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "modificar", "modificado", "modificación" y cualquier variación de los mismos, cuando se utilizan para referirse a un oligonucleótido significan que el oligonucleótido comprende al menos una fracción no natural, como por ejemplo al menos una fracción de azúcar no natural, al menos una unión de internucleósido no natural, al menos una fracción de base nucleótido no natural y/o al menos una fracción que no se produce de forma natural en oligonucleótidos (como por ejemplo, un espaciador de 3 carbonos o un hexaetilén glicol (HEG)). En algunas realizaciones, al menos una de las cuatro bases de nucleótido constituyentes (es decir, A, G, T/U y C) del oligonucleótido es un nucleótido modificado. En algunas de dichas realizaciones, el nucleótido modificado comprende una fracción de base que es más hidrófoba que la base de origen natural. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado confiere resistencia a la nucleasa al oligonucleótido. En algunas realizaciones, cuando un aptámero comprende uno o más nucleótidos modificados que comprenden fracciones de base hidrófobas, el aptámero se une a su diana, como por ejemplo una proteína, a través de interacciones predominantemente hidrófobas. En algunas realizaciones, dichas interacciones hidrófobas son el resultado de una alta eficiencia de unión y complejos co-cristalinos estables. Una pirimidina con una sustitución en la posición C-5 es un ejemplo de un nucleótido modificado. Las modificaciones pueden incluir también modificaciones 3' y 5', como por ejemplo sellado. Otras modificaciones pueden incluir sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural, con un análogo, modificaciones de internucleótido como por ejemplo aquellas con uniones sin carga (p.ej., metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y aquellas con uniones cargadas (p.ej., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos con intercaladores (p.ej., acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen queladores (p.ej., metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen alquilantes y las que tienen lugar con uniones modificadas (p.ej., ácidos nucleicos alfa anómicos, etc.). Asimismo, puede reemplazarse cualquier grupo hidroxilo presente normalmente en el azúcar de un nucleótido por un grupo fosfonato o un grupo fosfato; protegerse mediante grupos protectores normales; o activarse para preparar uniones adicionales con nucleótidos adicionales o con un soporte sólido. Los grupos OH 5' y 3' terminales pueden fosforilarse o sustituirse con aminas, fracciones de grupos de sellado orgánicos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, polímeros de polietilén glicol (PEG), en algunas realizaciones, que oscilan entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80 kDa, polímeros PEG, en algunas realizaciones, que oscilan entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60 kDa u otros polímeros sintéticos o biológicos hidrófilos o hidrófobos. En una realización, las modificaciones están en la posición C-5 de pirimidinas. Estas modificaciones se pueden producir a través de una unión amida directamente en la posición C5- o a través de otros tipos de uniones.

Los polinucleótidos pueden contener también formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa conocidos generalmente en la técnica, incluyendo 2'-O-metilo-, 2'-O-alil-, 2'-flúor- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α -anómicos, azúcares epiméricos como azúcares arabinosa, xilosos o lixosos, piranosa, azúcares furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y anicíclicos y análogos de nucleósido abásicos, como ribosida. Tal como se ha señalado anteriormente, puede reemplazarse una o más uniones fosfodiéster mediante grupos de unión alternativos. dichos grupos de unión alternativos incluyen realizaciones en las que el fosfato está sustituido por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o álcali sustituido o sin sustituir (1-20 C) que contiene opcionalmente una unión éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o aralquilo. No es necesario que todas las uniones de un polinucleótido sean idénticas. La sustitución de las formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa para diseñar un producto final, como lo pueden ser estructuras de cadena principal alternativas, como una cadena principal de poliamina, por ejemplo.

Modulado: Tal como se utiliza en el presente documento, "modulado" significa alterar, ya sea aumentando o disminuyendo el nivel de estabilidad, procesamiento y/o actividad de una diana.

Ácido nucleico: Tal como se utiliza en el presente documento, "ácido nucleico," "oligonucleótido," y "polinucleótido" se emplean indistintamente para referirse a un polímero de nucleótidos e incluye ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN y versiones modificadas de dichas entidades. Los términos "polinucleótido," "oligonucleótido," y "ácido nucleico" incluyen moléculas de mono o doble cadena, así como moléculas triples-helicoidales. El término ácido nucleico incluye aptámeros, pero no se limita a ellos (es decir, el término incluye otros polímeros de nucleótidos).

Nucleasa: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "nucleasa" se refiere a una enzima capaz de escindir un enlace fosfodiéster entre subunidades de nucleótido de un oligonucleótido. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "endonucleasa" se refiere a una enzima que escinde el (los) enlace(s) fosfodiéster en un sitio interno del oligonucleótido. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "exonucleasa" se refiere a una enzima que escinde el (los) enlace(s) fosfodiéster que unen los nucleótidos del extremo de un oligonucleótido. Los fluidos biológicos contienen normalmente una mezcla tanto de endonucleasas como exonucleasas.

Resistente a nucleasa: Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "resistente a nucleasa" y "resistencia a nucleasa" se refieren a una menor capacidad de un oligonucleótido para servir como sustrato para una endo- o exonucleasa, de manera que cuando entra en contacto con dicha enzima, el oligonucleótido o bien no se degrada o se degrada con mayor lentitud o en un menor grado que el oligonucleótido de control de una longitud y secuencia similar pero que carece de una o más modificaciones del oligonucleótido cuya resistencia a la nucleasa se está midiendo.

Nucleótido: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido o una forma modificada de los mismos. Los nucleótidos incluyen especies que incluyen purinas (p.ej., adenina, hipoxantina, guanina y similares) así como pirimidinas (p.ej., citosina, uracilo, timina y similares). Cuando una base se indica como "A", "C", "G", "U" o "T", se pretende que abarque tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos y formas modificadas de los mismos.

Farmacéuticamente aceptable: Farmacéuticamente aceptable, tal como se utiliza en el presente documento, significa aprobado por una agencia reguladora de una administración federal o estatal o enumerada en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y, más en particular, en seres humanos.

Sal farmacéuticamente aceptable: Sal farmacéuticamente aceptable del compuesto (p.ej. aptámero) tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un producto que contiene el compuesto y uno o más átomos o grupos farmacéuticamente aceptables adicionales unidos al compuesto a través de un enlace(s) iónico(s). En algunas realizaciones, una sal farmacéuticamente aceptable se produce por contacto del compuesto con un ácido o una base. Una sal farmacéuticamente aceptable puede incluir, pero sin limitarse a ellas, sales de adición de ácido, incluyendo clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, hidrógeno sulfatos, alquilsulfonatos, arilsulfonatos, arilalquilsulfonatos, acetatos, benzoatos, citratos, maleatos, fumaratos, succinatos, lactatos y tartaratos; cationes de metal alcalino como Li, Na, K, sales de metales alcalinotérreos como Mg o Ca o sales de amina orgánica. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aptámero" incluye aptámeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, a no ser que se indique específicamente de otro modo.

Composición farmacéutica: Composición farmacéutica, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una formulación que comprende un compuesto (como por ejemplo un aptámero) en una forma adecuada para su administración a un individuo. Una composición farmacéutica se formula normalmente para que sea compatible con la ruta de administración pretendida. Entre los ejemplos de rutas de administración se incluyen, pero sin limitarse a ellas, intravítrea, enteral y parenteral, incluyendo, p.ej., inyección o infusión subcutánea, inyección o infusión intravenosa, inyección intra-articular, inyección e infusión intraarterial, inyección e implantación intra-humor acuoso e inyección e implantación intra-vítrea.

Proteína: Tal como se utiliza en el presente documento, "proteína" es se utiliza como sinónimo de "péptido," "polipéptido," o "fragmento de péptido." Un polipéptido, proteína, péptido o fragmento de péptido "purificado" está sustancialmente desprovisto de material celular u otras proteínas contaminantes derivadas de la fuente de células, tejido o fuente desprovista de células desde la que se obtiene la proteína purificada o está sustancialmente desprovisto de precursores químicos y otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente.

SELEX: El término SELEX, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere generalmente a la selección de ácidos nucleicos que interactúan con una molécula diana de manera deseable por ejemplo por unión con alta afinidad con una proteína; y la amplificación de dichos ácidos nucleicos seleccionados. SELEX puede utilizarse para identificar aptámeros con alta afinidad a una molécula diana específica. El término SELEX y "proceso SELEX" pueden utilizarse indistintamente. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de selección de aptámeros que se unen a una molécula diana que comprenden: (a) preparación de una mezcla candidato de ácidos nucleicos,

en la que la mezcla candidato comprende ácidos nucleicos modificados en los que al menos una pirimidina en al menos un ácido nucleico o en cada ácido nucleico de la mezcla candidato está químicamente modificado en la posición C5; (b) contacto de la mezcla candidato con la molécula diana, en la que ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad con la molécula diana en relación con otros ácidos nucleicos de la mezcla candidato se unen a la molécula diana formando complejos de ácido nucleico-molécula diana; (c) división de los ácidos nucleicos de mayor afinidad desde el resto de la mezcla candidato; y (d) amplificación de los ácidos nucleicos de mayor afinidad para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en secuencias de ácido nucleico que son capaces de unirse a la molécula diana con una mayor afinidad, en virtud de lo cual se identifica el aptámero para la molécula diana. En ciertas realizaciones, el método incluye además la realización de un proceso de enriquecimiento de constante de disociación lenta.

Identidad de secuencia: Identidad de secuencia, tal como se utiliza en el presente documento, en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico es una función del número de posiciones de nucleótido idénticas compartidas por las secuencias (es decir % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones en la más corta de las dos secuencias que se comparan x100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco que debe introducirse para optimizar el alineamiento de dos o más secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos o más secuencias puede llevarse a cabo utilizando un algoritmo matemático como los programas BLAST y Gapped BLAST en sus parámetros por defecto (p.ej. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990; véase también BLASTN en www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Para las comparaciones de secuencia, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen las secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de secuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencia. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para una secuencia(s) de ensayo en relación con la secuencia de referencia, sobre la base de los parámetros de programa designados. El alineamiento de secuencias óptimo para la comparación puede llevarse a cabo, p.ej. con un algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482, 1981, con el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443, 1970, a través del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. Estados Unidos 85:2444, 1988, a través de implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Grupo Genetics Computer, 575 Science Dr., Madison, Wis.) o a simple vista (véase de forma general, Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, pub. de Greene Publishing Assoc. y Wiley- Interscience (1987)). Tal como se utiliza en el presente documento, cuando se describe el porcentaje de identidad de un ácido nucleico, como pueda ser un aptámero, cuya secuencia que es idéntica por ejemplo en al menos aproximadamente 95 % con respecto a la secuencia de nucleótido de referencia, se pretende que la secuencia de ácidos nucleicos sea idéntica a la secuencia de referencia salvo que la secuencia de ácidos nucleicos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de referencia. Dicho de otra forma, para obtener la secuencia de ácidos nucleicos deseada, pueden estar suprimidos o sustituidos hasta un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia en la secuencia que es idéntica en aproximadamente un 95 % con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos de referencia por otro nucleótido o puede insertarse en la secuencia de referencia una serie de nucleótidos en hasta un 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia (denominado en el presente documento inserción). Estas mutaciones de la secuencia de referencia para generar la secuencia deseada pueden tener lugar en las posiciones terminales 5' y 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre dichas posiciones terminales, intercalada o individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

SOMAmérico: Tal como se utiliza en el presente documento, un "SOMAmérico" o aptámero modificado de constante de disociación lenta se refiere a un aptámero (incluyendo aptámeros que comprenden al menos un nucleótido con una modificación hidrófoba) con una constante de disociación ($t_{1/2}$) de ≥ 30 minutos, ≥ 60 minutos, ≥ 90 minutos, ≥ 120 minutos, ≥ 150 minutos, ≥ 180 minutos, ≥ 210 minutos o ≥ 240 minutos. En algunas realizaciones, los SOMAméricos se generan utilizando los métodos SELEX mejorados descritos en la patente estadounidense 7.947.447, titulada "Método para generar aptámeros con una mejor Constante de disociación".

Espaciador: Un espaciador, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula(s) pequeña(s) que no es un nucleósido que forma parte de un oligonucleótido modificado y que normalmente ocupa el lugar de un nucleósido en el oligonucleótido modificado. Entre los ejemplos de secuencias de espaciador se incluyen, pero sin limitarse a ellas, polietilén glicoles, cadenas de hidrocarburos (como por ejemplo un espaciador de 3 carbonos) y otros polímeros o copolímeros. En algunas realizaciones, un espaciador proporciona un andamio molecular covalente que conecta dos regiones (como por ejemplo dos regiones de consenso o conservadas) de un aptámero al mismo tiempo que preserva la actividad del aptámero. En ciertos aspectos, la secuencia de espaciador puede estar unida covalentemente a un nucleótido adyacente a través de la posición 3' o 5' de la fracción de azúcar (incluyendo la fracción de azúcar modificada) del nucleótido)

Inhibe(n) sustancialmente: Inhibe(n) sustancialmente, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un bloqueo parcial o completo, por ejemplo, cualquier reducción cuantificable o al menos una inhibición o reducción de

la actividad o efecto en relación con el control de un 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 90 %. En algunas realizaciones, inhibición de la actividad de una diana o un efecto sobre una diana (por ejemplo escisión de la diana) se mide en presencia de un aptámero y el control en condiciones sustancialmente similares en ausencia del aptámero. En algunas realizaciones, la actividad medida es la actividad del sistema del complemento. Las personas especializadas en la técnica podrán apreciar los diferentes ensayos y métodos que se pueden emplear para medir el nivel de actividad y, por tanto, la inhibición del sistema del complemento. Un ejemplo de método que se puede emplear para determinar el grado de inhibición del sistema del complemento incluye cualquier ensayo para determinar la hemólisis mediada por complemento, descrita con mayor detalle en el Ejemplo 3. Otro ejemplo de método incluye la medición del grado de escisión proteolítica de la proteína C3 en C3a y C3b tal como se describe con mayor detalle en el Ejemplo 4.

Diana molecular: Diana molecular (o diana), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto o molécula que tiene una estructura química tridimensional distinta a la de un polinucleótido con la que puede actuar un aptámero en una manera deseable. Entre los ejemplos no exhaustivos de molécula diana se incluyen una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido, polisacárido, glucoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, patógeno, sustancia tóxica, sustrato, metabolito, análogo de estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento, célula, tejido, cualquier porción o fragmento de cualquiera de los anteriores, etc., Prácticamente, puede ser una diana adecuada cualquier efector químico o biológico. Pueden servir como dianas moléculas de cualquier tamaño. Se puede modificar también una diana de diferentes maneras para potenciar la probabilidad o intensidad de una interacción entre la diana y el ácido nucleico. Una diana puede incluir asimismo cualquier variación menor de un compuesto o molécula en particular, como por ejemplo en el caso de una proteína, por ejemplo, variaciones menores en su secuencia de aminoácidos, formación de un enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, incluyendo conjugación con un componente marcador que no altera sustancialmente la identidad de la molécula. Una "molécula diana" o "diana" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula o estructura multimolecular capaz de unirse a un aptámero. "Moléculas diana" o "dianas" se refieren a más de uno de dichos conjuntos de moléculas.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa generalmente la cantidad necesaria para mejorar al menos un síntoma de un trastorno o una afección que se previene, reduce o trata tal como se ha descrito en el presente documento. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" en relación con los aptámeros de la presente divulgación significa la dosis de aptámero que proporciona la respuesta farmacológica específica para la que se administra el aptámero en un número significativo de individuos que necesitan dicho tratamiento. Debe subrayarse que la cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero que se administra a un individuo en particular en un caso concreto no siempre será la eficaz para el tratamiento de las afecciones/enfermedades descritas en el presente documento, aunque dicha dosis se considere como terapéuticamente eficaz entre las personas especializadas en la técnica.

Los artículos "un", "él/la" en singular incluyen los referentes en plural a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. "Que comprende A o B" significa que incluye A o B o A y B. Asimismo ha de entenderse que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos y todos los pesos moleculares o valores de masa molecular dados para los ácidos nucleicos y polipéptidos son aproximados y se proporcionan con fines descriptivos.

Asimismo, los intervalos proporcionados en el presente documento han de entenderse como una forma abreviada de todos los valores que entran en el intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, o combinación de números o sub-intervalo del grupo que consiste en 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, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 (así como fracciones de los mismos, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario). Ha de entenderse que cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relaciones o intervalo de números enteros incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando sea apropiado, fracciones del mismo (como por ejemplo la décima parte o la centésima parte de un número entero), a no ser que se indique lo contrario. Asimismo, ha de entenderse que cualquier intervalo de números citado en el presente documento en relación con cualquier característica física, como puedan ser subunidades de polímero, tamaño o grosor incluye cualquier número entero dentro del intervalo citado, a no ser que se indique lo contrario. Tal como se utiliza en el presente documento, "aproximadamente" o "que consiste esencialmente en media \pm 20 % del intervalo, valor o estructura indicados a no ser que se indique lo contrario. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "incluye" y "comprende" son abiertos y se utilizan como sinónimos. Debe entenderse que los términos "un" y "uno/a", tal como se utilizan en el presente documento se refieren a "uno o más" de los componentes enumerados. Ha de entenderse que el uso de la alternativa (p.ej., "o") significa uno, ambos o cualquier combinación de las alternativas.

A continuación, se describen métodos y materiales, si bien en la práctica o análisis de la presente divulgación es posible utilizar otros métodos o materiales similares o equivalentes a los descritos.

En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de los términos. Por otra parte, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos únicamente y no se pretende que sean exhaustivos.

II. Descripción general

5

La presente invención proporciona aptámeros que se unen específicamente a proteína C3 (a veces se ha referencia a ellos como "aptámeros C3"). En algunas realizaciones, un aptámero inhibe la escisión de proteína C3.

10 En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a una proteína C3, en el que el aptámero comprende la secuencia 5'- KPGRMPDVD_nLPWPSVGPAYRPP -3' (SEQ ID NO: 152), en la que K es una pirimidina modificada en C-5, C, U, T, G o un espaciador de 3 carbonos; cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; R es A o G; M es C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos; cada D es independientemente, y cada vez que aparece, A, C o un espaciador de 3 carbonos; cada V es independientemente, y cada vez que aparece, A, G, C o un espaciador de 3 carbonos; L es A, U, T o una pirimidina modificada en C-5; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; Y es C, U o T; y n es 0 o 1. En algunas realizaciones, el aptámero comprende la secuencia 5'- KPGRMPDVD_nLPWPSVGPAYRPPM -3' (SEQ ID NO: 153), en la que cada M es independientemente, y cada vez que aparece, C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos.

20 En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a una proteína C3, en el que el aptámero comprende la secuencia 5'- KPGRMPDVD_nLPWPSVGPACGPP -3' (SEQ ID NO: 131), en la que K es una pirimidina modificada en C-5, C, U, T, G o un espaciador de 3 carbonos; cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; R es A o G; M es C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos; cada D es independientemente, y cada vez que aparece, A, C o un espaciador de 3 carbonos; cada V es independientemente, y cada vez que aparece, A, G, C o un espaciador de 3 carbonos; L es A, U, T o una pirimidina modificada en C-5; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; y n es 0 o 1. En algunas realizaciones, el aptámero comprende la secuencia 5'- KPGRMPDVD_nLPWPSVGPACGPPM -3' (SEQ ID NO: 135), en la que cada M es independientemente, y cada vez que aparece, C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos.

30 En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a una proteína C3, en el que el aptámero comprende la secuencia 5'- KPGRMPXPAWPSVGPAYRPP -3' (SEQ ID NO: 154), en la que K es una pirimidina modificada en C-5, C, U, T, G o un espaciador de 3 carbonos; cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; R es A o G; M es C, U, T una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos; V es A, G, C o un espaciador de 3 carbonos; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; Y es C, U o T; y X es un engarce seleccionado entre un engarce de C₂-C₂₀ sustituido o sin sustituir, un alquilen glicol y un polialquilen glicol. En algunas realizaciones, el aptámero comprende la secuencia 5'-KPGRMPXPAWPSVGPAYRPPM -3' (SEQ ID NO: 155), en la que cada M es independientemente, y cada vez que aparece, C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos.

40 En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a la proteína C3, en el que el aptámero comprende la secuencia 5'- KPGRMPXPAWPSVGPACGPP -3' (SEQ ID NO: 136), en la que K es una pirimidina modificada en C-5, C, U, T, G o un espaciador de 3 carbonos; cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; R es A o G; M es C, U, T una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos; V es A, G, C o un espaciador de 3 carbonos; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; y X es un engarce seleccionado entre un engarce de C₂-C₂₀ sustituido o sin sustituir, un alquilen glicol y un polialquilen glicol. En algunas realizaciones, el aptámero comprende la secuencia 5'- KPGRMPXPAWPSVGPACGPPM-3' (SEQ ID NO: 137), en la que cada M es independientemente, y cada vez que aparece, C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos.

50 En cualquiera de las realizaciones descritas, K puede ser una pirimidina modificada en C-5, C o G; cada M puede ser independientemente, y cada vez que aparece, C o una pirimidina modificada en C-5; y/o L puede ser A o pirimidina modificada en C-5.

55 En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a proteína C3, en el que el aptámero comprende la secuencia 5'- PAWPSVGPAYRPP -3' (SEQ ID NO: 156), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; V es A, G o C; Y es C, U o T; y R es G o A.

60 En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a proteína C3, en el que el aptámero comprende la secuencia 5'- PAWPSVGPACGPP -3' (SEQ ID NO: 134), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; W es G o un espaciador de 3 carbonos; y S es C o un espaciador de 3 carbonos; V es A, G o C.

65 En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a proteína C3, en el que el aptámero comprende una secuencia que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99

% o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 4 a 130 y 138 a 151, en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5. En algunas realizaciones, cada P es NapdU. En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a proteína C3 en el que el aptámero comprende una secuencia que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 4 a 28, 32 a 34, 37 a 75, 78 a 118, 121 a 130 y 139 a 151, en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5. En algunas realizaciones, cada P es NapdU.

En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a proteína C3, en el que el aptámero comprende una primera región y una segunda región, en la que la primera región comprende la secuencia 5'-PAGPC-3' (SEQ ID NO: 132) y la segunda región comprende la secuencia 5'-GPAYRPP-3' (SEQ ID NO: 156), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; Y es C, U o T; y R es G o A. En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a proteína C3, en el que el aptámero comprende una primera región y una segunda región, en la que la primera región comprende la secuencia 5'-PAGPC-3' (SEQ ID NO: 132) y la segunda región comprende la secuencia 5'-GPACGPP-3' (SEQ ID NO: 133), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5.

En algunas realizaciones, el extremo 3' de la primera región está covalentemente unido al extremo 5' de la segunda región. En algunas realizaciones, la primera región y la segunda región están unidas covalentemente mediante al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco engarces, en la que cada engarce se selecciona independientemente entre un nucleótido, un engarce de C₂-C₂₀ sustituido o sin sustituir, un alquilen glicol y un polialquilen glicol. En algunas realizaciones, se selecciona cada engarce independientemente entre un nucleótido, un espaciador de 3 carbonos y un hexaetilen glicol.

En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a proteína C3, en el que el aptámero comprende la secuencia 5'-PAGPC-3' (SEQ ID NO: 132), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5. En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a proteína C3, en el que el aptámero comprende la secuencia 5'-GPACGPP-3' (SEQ ID NO: 133), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5. En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a proteína C3, en el que el aptámero comprende la secuencia 5'-GPAYRPP-3' (SEQ ID NO: 156), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; Y es C, U o T; y R es G o A.

En algunas realizaciones, se proporciona un aptámero que se une a proteína C3, en el que el aptámero comprende la secuencia de SEQ ID NO: 125, en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5. En algunas realizaciones, cada P es NapdU.

En algunas realizaciones de los aptámeros descritos en el presente documento, cada pirimidina modificada en C-5 se selecciona independientemente entre: 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-fenilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (PEdU), 5-(N-tiofenilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ThdU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-tirosilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TyrdU), 5-(N-3,4-metilendioxiobencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (MBndU), 5-(N-4-fluorobencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (FBndU), 5-(N-3-fenilpropilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (PPdU), 5-(N-imidazoliletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ImdU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-R-treoninilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ThrdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NapdU), 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NEdU), 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NEdU), 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BFdU), 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BTdU), 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina y 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina. En algunas realizaciones, cada pirimidina modificada en C-5 se selecciona independientemente entre: 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NapdU), 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NEdU), 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NEdU), 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BFdU), 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BTdU), 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina y 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina.

2'-fluorouridina. En algunas realizaciones, cada pirimidina modificada en C-5 es 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU).

5 En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el aptámero puede comprender al menos un nucleótido modificado con 2'-O-metilo.

10 En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el aptámero puede ser de aproximadamente 24 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 28 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud o aproximadamente 28 nucleótidos de longitud. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el aptámero puede ser de 24 a 100 nucleótidos de longitud o de 30 a 60 nucleótidos de longitud o de 28 a 60 nucleótidos de longitud o de 28 a 50 nucleótidos de longitud o de 28 a 40 nucleótidos de longitud o de 40 a 50 nucleótidos de longitud o de 28 a 32 nucleótidos de longitud.

15 En algunas realizaciones, un aptámero descrito en el presente documento se une a una proteína C3 e inhibe la escisión de proteína C3. En algunas realizaciones, la proteína C3 es proteína C3 humana.

20 En algunas realizaciones, el aptámero C3 puede incluir hasta aproximadamente 100 nucleótidos, hasta aproximadamente 95 nucleótidos, hasta aproximadamente 90 nucleótidos, hasta aproximadamente 85 nucleótidos, hasta aproximadamente 80 nucleótidos, hasta aproximadamente 75 nucleótidos, hasta aproximadamente 70 nucleótidos, hasta aproximadamente 65 nucleótidos, hasta aproximadamente 60 nucleótidos, hasta aproximadamente 55 nucleótidos, hasta aproximadamente 50 nucleótidos, hasta aproximadamente 45 nucleótidos, hasta aproximadamente 40 nucleótidos, hasta aproximadamente 35 nucleótidos, hasta aproximadamente 30 nucleótidos, hasta aproximadamente 25 nucleótidos o hasta aproximadamente 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, el aptámero C3 puede consistir en hasta 100 nucleótidos, hasta 95 nucleótidos, hasta 90 nucleótidos, hasta 85 nucleótidos, hasta 80 nucleótidos, hasta 75 nucleótidos, hasta 70 nucleótidos, hasta 65 nucleótidos, hasta 60 nucleótidos, hasta 55 nucleótidos, hasta 50 nucleótidos, hasta 45 nucleótidos, hasta 40 nucleótidos, hasta 35 nucleótidos, hasta 30 nucleótidos, hasta 25 nucleótidos o hasta 20 nucleótidos.

30 En otro aspecto de la presente divulgación, el aptámero C3 puede ser al menos 99 % idéntico, al menos 95 % idéntico, al menos 90 % idéntico, al menos 85 % idéntico, al menos 80 % idéntico o al menos 75 % idéntico a cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 151. En otro aspecto de la presente divulgación, el aptámero C3 puede ser al menos 95 % idéntico, al menos 90 % idéntico, al menos 85 % idéntico, al menos 80 % idéntico o al menos 75 % idéntico a cualquiera de las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 4 a 28, 32 a 34, 37 a 75, 78 a 118, 121 a 130 y 139 a 151. En algunas realizaciones, un aptámero que se une a C3 es 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: SEQ ID NO: 4 a 28, 32 a 34, 37 a 75, 78 a 118, 121 a 130 y 139 a 151. En un aspecto relacionado, los fragmentos de las mismas son de 25 a 49 nucleótidos de longitud (o de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos de longitud a 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos de longitud). En algunas realizaciones, un aptámero que se une a C3 es de 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos de longitud.

45 En otro aspecto de la presente divulgación, el aptámero C3 puede tener una constante de disociación (K_d) para C3 de aproximadamente 10 nM o menos. En otra realización ilustrativa, el aptámero C3 tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína C3 de aproximadamente 15 nM o menos. En otra realización ilustrativa más, el aptámero C3 tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína C3 de aproximadamente 20 nM o menos. En otra realización ilustrativa más, el aptámero C3 tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína C3 de aproximadamente 25 nM o menos. En otra realización ilustrativa más, el aptámero C3 tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína C3 de aproximadamente 30 nM o menos. En otra realización ilustrativa más, el aptámero C3 tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína C3 de aproximadamente 35 nM o menos. En otra realización ilustrativa más, el aptámero C3 tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína C3 de aproximadamente 40 nM o menos. En otra realización ilustrativa más, el aptámero C3 tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína C3 de aproximadamente 45 nM o menos. En otra realización ilustrativa más, el aptámero C3 tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína C3 de aproximadamente 50 nM o menos. En otra realización ilustrativa más, el aptámero C3 tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína C3 en un intervalo de aproximadamente 2pM a aproximadamente 10 nM (o 2pM, 3 pM, 4 pM, 5 pM, 6 pM, 7 pM, 8 pM, 9 pM, 10 pM, 15 pM, 20 pM, 25 pM, 30 pM, 35 pM, 40 pM, 45 pM, 50 pM, 60 pM, 70 pM, 80 pM, 90 pM, 100 pM, 150 pM, 200 pM, 250 pM, 300 pM, 350 pM, 400 pM, 450 pM, 500 pM, 550 pM, 600 pM, 650 pM, 700 pM, 750 pM, 800 pM, 850 pM, 900 pM, 950 pM, 1000 pM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 6 nM, 7 nM, 8 nM, 9 nM o 10 nM). En otra realización ilustrativa más, el aptámero C3 tiene una constante de disociación (K_d) para la proteína C3 en el intervalo de al menos 2pM (o al menos 2pM, 3 pM, 4 pM, 5 pM, 6 pM, 7 pM, 8 pM, 9 pM, 10 pM, 15 pM, 20 pM, 25 pM, 30 pM, 35 pM, 40 pM, 45 pM, 50 pM, 60 pM, 70 pM, 80 pM, 90 pM, 100 pM, 150 pM, 200 pM, 250 pM, 300 pM, 350 pM, 400 pM, 450 pM, 500 pM, 550 pM, 600 pM, 650 pM, 700 pM, 750 pM, 800 pM, 850 pM, 900 pM, 950 pM, 1000 pM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 6 nM, 7 nM, 8 nM, 9 nM o 10 nM). Se puede determinar una constante de disociación adecuada a través de un ensayo de unión utilizando una titulación de varios puntos y aplicando la ecuación $y = (\max - \min)(\text{Proteína}) / (K_d + \text{Proteína}) + \min$ tal como se describe en el Ejemplo 2. Ha de entenderse que la determinación

de las constantes de disociación depende en gran medida de las condiciones en las que se miden y por lo tanto, estos números pueden variar significativamente según factores como tiempo de equilibrio, etc., En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el aptámero, molécula de ácido nucleico comprende nucleótidos de ADN, ARN o una combinación de los mismos.

5

SELEX

SELEX incluye generalmente la preparación de una mezcla candidato de ácidos nucleicos, la unión de la mezcla candidato a la molécula diana deseada para formar un complejo de afinidad, la separación de los complejos de afinidad de los ácidos nucleicos candidatos sin unir, separación y aislamiento del ácido nucleico desde el complejo de afinidad, purificación del ácido nucleico e identificación de la secuencia de aptámeros específica. El proceso puede incluir varias rondas para refinar aún más la afinidad del aptámero seleccionado. El proceso puede incluir etapas de amplificación en uno o más puntos de este proceso. Véase, p.ej., la patente estadounidense No. 5.475.096, titulada "Ligandos de ácido nucleico". Puede utilizarse el proceso SELEX para generar un aptámero que se une covalentemente a su diana, así como un aptámero que no se une covalentemente a su diana. Véase, p.ej., patente estadounidense No. 5.705.337 titulada "Evolución sistemática de ligandos de ácido nucleico por enriquecimiento exponencial: Chemi-SELEX".

10

15

20

25

30

Puede utilizarse el proceso SELEX para identificar aptámeros de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren mejores características al aptámero, como por ejemplo una mejor estabilidad *in vivo* o mejores características de administración. Entre los ejemplos de dichas modificaciones se incluyen sustituciones químicas en las posiciones de base y/o ribosa y/o fosfato. Los aptámeros identificados a través de un proceso SELEX que contienen nucleótidos modificados se describen en la patente estadounidense No. 5.660.985, titulada "Ligandos de ácido nucleico de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados" que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótido químicamente modificados en las posiciones 5'- y 2'- de pirimidinas. La patente estadounidense No. 5.580.737, consúltese lo anterior, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH₂), 2'-flúor (2'-F), y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). Véase también la publicación de solicitud de patente estadounidense 20090098549, titulada "SELEX y FOTOSELEX", que describe bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen propiedades físicas y químicas expandidas y su uso en SELEX y FotoSELEX.

35

40

45

Asimismo, puede utilizarse SELEX para identificar aptámeros que tienen las características de constante de disociación deseadas. Véase la publicación de solicitud de patente estadounidense 20090004667, titulada "Método para generar aptámeros con mejores constantes de disociación", que describe métodos SELEX mejorados para generar aptámeros que pueden unirse a moléculas diana. Tal como se ha mencionado, dichos aptámeros de constante de disociación baja son conocidos como "SOMAmoros". Se describen métodos para producir aptámeros o SOMAmoros y fotoaptámeros o SOMAmoros que tienen constantes de disociación más bajas desde sus moléculas diana correspondientes. Los métodos implican el contacto de la mezcla candidato con la molécula diana, permitir que tenga lugar la formación de complejos ácido nucleico-diana y realizar un proceso de enriquecimiento de constante de disociación lenta en el que se disociarán los complejos de ácido nucleico-diana con constantes de disociación rápida y no se volverán a formar, al mismo tiempo que los complejos con constantes de disociación lenta permanecerán intactos. Asimismo, los métodos incluyen el uso de nucleótidos modificados en la producción de mezclas de ácidos nucleicos candidato para generar aptámeros o SOMAmoros con un mejor comportamiento de disociación.

50

55

60

Una variación de este ensayo emplea aptámeros que incluyen grupos funcionales fotorreactivos que permiten la unión covalente de aptámeros o "fotorreticulación" con sus moléculas diana. Véase, p.ej., Patente estadounidense No. 6.544.776 titulada "Biochip de diagnóstico de ligando de ácido nucleico". Puede hacerse referencia a estos aptámeros fotorreactivos también como fotoaptámeros. Véase, p.ej., patente estadounidense No. 5.763.77, patente estadounidense No. 6.001.577 y patente estadounidense No. 6.291.184, tituladas cada una de ellas "Evolución sistemática de ligandos de ácido nucleico por enriquecimiento exponencial: Fotoselección de ligandos de ácido nucleico y solución SELEX". Véase también p.ej., patente estadounidense No. 6.458.539, titulada "Fotoselección de ligandos de ácido nucleico". Una vez que se pone en contacto la micromatriz con la muestra y que los fotoaptámeros han tenido la oportunidad de unirse a sus moléculas diana, se fotoactivan los fotoaptámeros y se lava el soporte sólido para eliminar cualquier molécula que no se haya unido específicamente. Es posible utilizar condiciones de lavado rigurosas, ya que por lo general las moléculas diana que se unen a los fotoaptámeros no se eliminan debido a los enlaces covalentes creados por el (los) grupo(s) funcional(es) fotoactivado(s) en los fotoaptámeros.

65

En estos dos formatos de ensayo, se inmovilizan los aptámeros o SOMAmoros en el soporte sólido antes de ponerlos en contacto con la muestra. En estas circunstancias, sin embargo, es posible que la inmovilización de los aptámeros o SOMAmoros antes del contacto con la muestra no proporcione un ensayo óptimo. Por ejemplo, la pre-inmovilización de los aptámeros o SOMAmoros puede tener como resultado un mezclado deficiente de los aptámeros o SOMAmoros con las moléculas diana en la superficie del soporte sólido, que quizá conduzca a períodos de reacción prolongados y, por lo tanto, a extensos períodos de incubación para dar cabida a la unión de los aptámeros o SOMAmoros a sus moléculas diana. Por otra parte, cuando se emplean fotoaptámeros o fotoSOMAmoros en el ensayo, y dependiendo del material utilizado como soporte sólido, el soporte sólido puede

tender a dispersar o absorber la luz utilizada para llevar a efecto la formación de enlaces covalentes entre los fotoaptámeros o fotoSOMAmoros y sus moléculas diana. Además, dependiendo del método empleado, la detección de las moléculas diana unidas a sus aptámeros o fotoSOMAmoros puede ser susceptible de imprecisión, ya que puede que la superficie del soporte sólido quede expuesta o afectada por cualquiera de los agentes marcadores utilizados. Finalmente, la inmovilización de los aptámeros o SOMAmoros en el soporte sólido implica generalmente una etapa de preparación de aptámero o SOMAmoro (es decir, inmovilización) antes de la exposición de los aptámeros o SOMAmoros a la muestra y esta etapa de preparación puede afectar a la actividad o funcionalidad de los aptámeros o SOMAmoros.

Se han descrito también ensayos de SOMAmoro que permiten que el SOMAmoro capture su diana en solución y que emplean después etapas de separación destinadas a eliminar los componentes específicos de la mezcla SOMAmoro-diana antes de la detección (véase, la publicación de solicitud de patente estadounidense 20090042206, titulada "Análisis multiplexados de muestras de ensayo"). Los métodos de ensayo de SOMAmoro descritos permiten la detección y cuantificación de una diana que no es ácido nucleico (p.ej., una diana proteína) en una muestra de ensayo detectando y cuantificando un ácido nucleico (es decir, SOMAmoro). Los métodos descritos crean un ácido nucleico sustituto (es decir, el SOMAmoro) para detectar y cuantificar una diana que no es ácido nucleico, permitiendo así la aplicación de una amplia gama de tecnologías de ácido nucleico para una gama más amplia de dianas deseadas, incluyendo dianas de proteína.

Las realizaciones del proceso SELEX en el que la diana es un péptido se describen en la patente estadounidense No. 6.376.190, titulada "Procesos SELEX modificados sin proteína purificada." En este caso, la diana es la proteína C3.

Proteína componente 3 (C3) del complemento

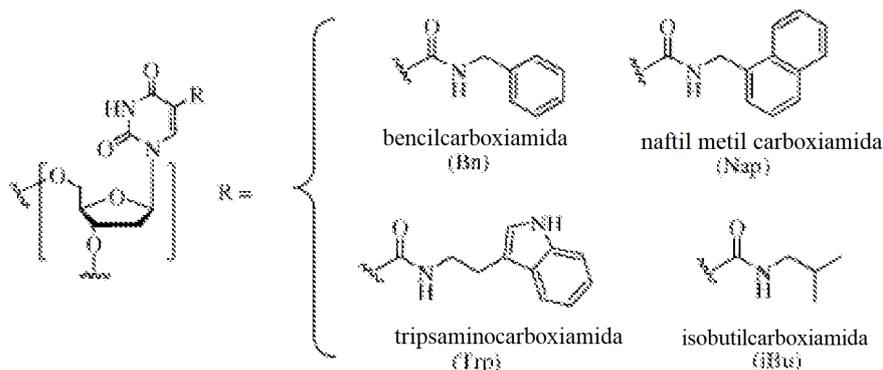
Se purificó la proteína C3 circulante humana nativa utilizada en el proceso SELEX desde la sangre y obtenida de Quidel® Corporation, San Diego, California (número de catálogo A401). Para los estudios de unión y actividad, se utilizó la proteína C3 nativa circulante de Quidel como proteína C3 humana circulante obtenida de COMPLEMENT TECHNOLOGY, Inc., Tiler, Texas (número de catálogo A113).

Modificaciones químicas en aptámeros

Los aptámeros pueden contener nucleótidos modificados que mejoran las propiedades y características. Entre los ejemplos no exhaustivos de dichas mejoras se incluyen estabilidad *in vivo*, estabilidad frente a la degradación, afinidad de unión para su diana y/o mejores características de administración.

Entre los ejemplos de dichas modificaciones se incluyen sustituciones químicas en las posiciones de base y/o ribosa y/o fosfato de un nucleótido. Los aptámeros identificados a través del proceso SELEX que contienen nucleótidos modificados se describen en la patente estadounidense No. 5.660.985, titulada "Ligandos de ácido nucleico de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados", que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótido químicamente modificados en las posiciones 5' y 2' de pirimidinas. La patente estadounidense No. 5.580.737, consúltese lo anterior, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino(2'-NH₂), 2'-flúor (2'-F), y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). Véase también, publicación de solicitud de patente estadounidense No. 20090098549, titulada "SELEX y FOTOSELEX," que describe bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen propiedades físicas y químicas expandidas y su uso en SELEX y fotoSELEX.

Entre los ejemplos específicos de modificación en C-5 se incluyen sustitución de desoxiuridina en la posición C-5 con un sustituyente seleccionado independientemente entre bencilcarboxiamida (alternativamente bencilaminocarbonilo) (Bn), naftilmetilcarboxiamida (alternativamente, naftilmetilaminocarbonilo) (Nap), triptaminocarboxiamida (alternativamente, triptaminocarbonilo) (Trp) y isobutilcarboxiamida (alternativamente, isobutilaminocarbonil) (iBu) tal como se ilustra inmediatamente a continuación:



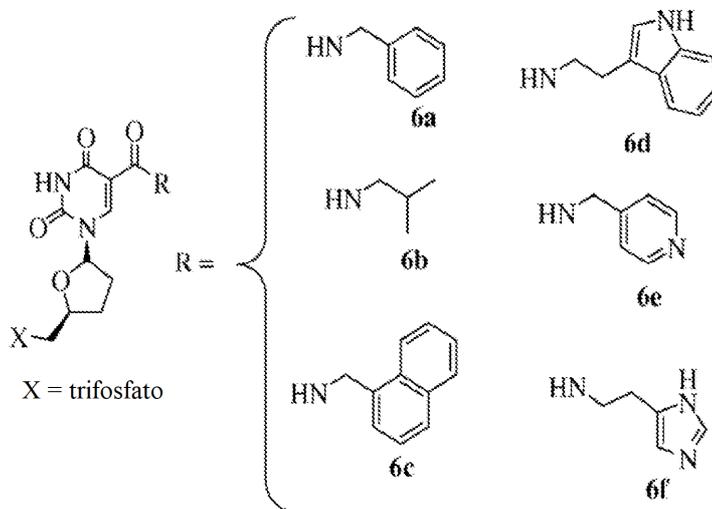
Las modificaciones químicas de una pirimidina modificada en C-5 también se combinan con modificaciones de azúcar en la posición 2' simples o en cualquier combinación, modificaciones en aminas exocíclicas y sustituciones de 4-tiouridina, y similares.

5 Entre las pirimidinas modificadas de C-5 representativas se incluyen: 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina o 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina).

15 En algunas realizaciones, cada X, Y, y/o Z se selecciona independientemente entre 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-fenilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (PedU), 5-(N-tiofenilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ThdU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina y 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina). En algunas realizaciones, cada Z es 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU).

25 Si está presente, puede impartirse una modificación de la estructura de nucleótido antes o después del ensamblaje del polinucleótido. Una secuencia de nucleótidos puede interrumpirse también con componentes que no son nucleótido. Un polinucleótido puede modificarse además tras la polimerización, como por ejemplo conjugación con un componente marcador.

30 Asimismo, los nucleótidos de pirimidina modificada en C-5 incluyen lo siguiente:



35 En algunas realizaciones, el nucleótido modificado confiere resistencia a la nucleasa al oligonucleótido. Una pirimidina con una sustitución en la posición C-5 es un ejemplo de nucleótido modificado. Las modificaciones pueden incluir modificaciones de la cadena principal, metilaciones, combinaciones de apareamiento de bases inhabituales, como por ejemplo, isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones pueden incluir también modificaciones 3' y 5' como sellado. Otras modificaciones pueden incluir sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones de internucleótido, como por ejemplo aquellas que tienen lugar uniones sin carga (p.ej. metil fosfonatos, fosfortriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y las que tienen lugar con uniones con carga (p.ej. , fosfortioatos, fosforoditioatos, etc.), las que tienen lugar con intercaladores (p.ej., acridina, psoraleno, etc.), las que contienen queladores (p.ej., metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), las que contienen alquilantes y las que tienen lugar con uniones modificadas (p.ej., ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). Asimismo, puede remplazarse cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en el

40

45 azúcar de un nucleótido por un grupo fosfonato o un grupo fosfato; protegerse con grupos protectores convencionales o activarse para preparar uniones adicionales para nucleótidos adicionales o para un soporte sólido. Los grupos OH terminales 5' y 3' pueden fosforilarse o sustituirse con aminas, fracciones de un grupo de sellado orgánico de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, polímeros de polietileno glicol (PEG) en

una realización en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 kDa, polímeros PEG en otra realización en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 kDa u otros polímeros sintéticos o biológicos hidrófilos o hidrófobos. En una realización, las modificaciones son en la posición C-5 de pirimidinas. Dichas modificaciones pueden producirse a través de una unión amida directamente en la posición C-5 o a través de otros tipos de uniones.

Los polinucleótidos pueden contener asimismo formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa conocidos generalmente en la especialidad, incluyendo 2'-O-metilo-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclicos, azúcares, α -anoméricos, azúcares epiméricos como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido abásicos, como metil ribosida. Tal como se ha señalado, puede reemplazarse una o más uniones fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Dichos grupos de unión alternativos incluyen realizaciones en las que el fosfato está reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o sin sustituir (1-20 C) que contiene opcionalmente una unión éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo y, cicloalquenilo o aralquilo. No todas las uniones en un polinucleótido han de ser idénticas. La sustitución de formas análogas de azúcares, purinas y pirimidinas puede ser ventajosa para diseñar un producto final, al igual que estructuras de cadena principal alternativas como la cadena principal de poliamida, por ejemplo.

La presente divulgación proporciona además una formulación que comprende dos o más secuencias de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-130 y 138-151, en las que P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5.

En otro aspecto, la pirimidina modificada en C-5 se selecciona independientemente entre: 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-fenilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (PEdU), 5-(N-tiofenilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ThdU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-tirosilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TyrdU), 5-(N-3,4-metilendioxi-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (MBndU), 5-(N-4-fluorobencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (FBndU), 5-(N-3-fenilpropilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (PPdU), 5-(N-imidazoliletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ImdU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-R-treoninilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ThrdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio)propil] carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)] carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NapdU), 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NEdU), 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NEdU), 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BFdU), 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BTdU), 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina y 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina.

En otro aspecto, la pirimidina modificada en C-5 se selecciona independientemente entre:

5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NapdU), 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NEdU), 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NEdU), 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftiletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BFdU), 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BTdU), 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina y 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina.

En otro aspecto, la pirimidina modificada en C-5 es 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU).

En otro aspecto, las dos o más moléculas de ácido nucleico de la formulación comprenden además al menos una modificación adicional seleccionada del grupo que consiste en nucleótido modificado con 2'-O-metilo, espaciador C3 y una combinación de los mismos.

En otro aspecto, las dos o más moléculas de ácido nucleico de la formulación comprenden además al menos una posición de nucleótido sustituida con un engarce HEG o un engarce PEG y/o que comprende además un engarce EG o un engarce PEG.

En otro aspecto, las dos o más moléculas de ácido nucleico de la formulación son cada una de ellas independientemente de aproximadamente 24 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud; o comprenden además al menos 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, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos adicionales.

En otro aspecto, la proteína de componente 3 (C3) del complemento es una proteína de componente 3 (C3) del complemento humana.

Composiciones farmacéuticas que comprenden aptámeros

En algunas realizaciones, se proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En "Remington: The Science y Practice of Pharmacy, 21ª edición," publicada por Lippincott Williams & Wilkins se describen vehículos adecuados.

Las composiciones farmacéuticas que incluyen al menos un aptámero descritas en el presente documento y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable pueden incluir también uno o más agentes activos que no son un inhibidor C3.

Los aptámeros descritos en el presente documento pueden utilizarse en una forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, formas farmacéuticas inyectables, dispersiones líquidas, geles, aerosoles, pomadas, cremas, formulaciones liofilizadas, polvos deshidratados, comprimidos, cápsulas, formulaciones de liberación controlada, formulaciones de fundido rápido, formulaciones de liberación sostenida, formulaciones de liberación prolongada, formulaciones de liberación intermitente, formulaciones de liberación controlada y de liberación inmediata mixtas, etc. Concretamente, los aptómeros descritos en el presente documento pueden formularse: (a) para administración seleccionada entre administración intravítrea, oral, pulmonar, intravenosa, intraarterial, intratecal, intra-articular, rectal, oftálmica, colónica, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local, bucal, nasal y tópica; (b) en una forma farmacéutica seleccionada entre cualquiera entre dispersiones líquidas, geles, aerosoles, pomadas, cremas, comprimidos, sobrecitos y cápsulas; (c) en una forma farmacéutica seleccionada entre formulaciones liofilizadas, polvos deshidratados, formulaciones de fundido rápido, formulaciones de liberación controlada, formulaciones de liberación sostenida, formulaciones de liberación prolongada, formulaciones de liberación intermitente y formulaciones mixtas de liberación controlada y liberación inmediata; o (d) cualquier combinación de ellas.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden comprender uno o más de los siguientes componentes: (1) un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilen glicoles, glicerina, propilen glicol y otros disolventes sintéticos; (2) agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metil parabenos; (3) antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito sódico; (4) agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; (5) tampones como acetatos, citratos y fosfatos; y (6) agentes para ajustar la tonicidad como cloruro sódico o dextrosa. Puede ajustarse el pH con ácidos o bases, como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. Se puede encerrar una preparación parenteral en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis fabricados de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición deberá ser estéril y deberá ser fluida en un grado en el que se pueda administrar con jeringuilla. La composición farmacéutica deberá ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deberá conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos.

El término "estable", tal como se utiliza en el presente documento significa que permanece en un estado o condiciones en las que es adecuado para su administración a un sujeto.

El vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión, incluyendo por ejemplo agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilen glicol, y polietilen líquido, y similares) y mezclas adecuados de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse por ejemplo utilizando un revestimiento, como por ejemplo lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismo puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y anti-fúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, como por ejemplo azúcares, polialcoholes como manitol o sorbitol y sales inorgánicas como cloruro sódico, en la composición. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

- Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el reactivo activo (p.ej., un aptámero) en una cantidad apropiada en un disolvente apropiado, con uno o una combinación de los ingredientes enumerados, según se desee, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando al menos un aptámero en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y cualquier otro ingrediente deseado. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, entre los ejemplos de métodos para la preparación se incluyen secado al vacío y liofilización, que producirán ambos un polvo de un aptámero junto con cualquier otro ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada para su esterilización previa.
- En algunas realizaciones, se formula un aptámero para inyección intravítrea. En "Remington: The Science y Practice of Pharmacy, 21ª edición" publicado por Lippincott Williams & Wilkins se describen formulaciones adecuadas para administración intravítrea, por ejemplo en Rawas-Qalaji et al. (2012) Curr. Eye Res. 37: 345; Bochot et al. (2012) J. Control Release 161:628; Yasukawa et al. (2011) Recent Pat. Drug Deliv. Formul. 5: 1; y Doshi et al. (2011) Semin. Ophthalmol. 26: 104 se explica la administración de fármaco ocular. En algunas realizaciones, se administra una composición farmacéutica que comprende un aptámero por inyección intravítrea una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada 10 semanas, una vez cada 11 semanas, una vez cada 12 semanas o menos, frecuentemente una vez cada 12 semanas.
- Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar por ejemplo en cápsulas de gelatina o comprimirse para formar comprimidos. Para los fines de una administración terapéutica oral, pueden incorporarse en el aptámero excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales pueden prepararse también utilizando un vehículo fluido para su uso como enjuague bucal, aplicándose el compuesto en el vehículo fluido oralmente por enjuague, expectoración o tragándolo. Los agentes de unión y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles pueden incluirse como parte de la composición.
- Para administración por inhalación, se administran los compuestos en forma de un pulverizador de aerosol desde un envase presurizado o dispensador que contiene un propelente adecuado, p.ej., un gas como pueda ser dióxido de carbono, un líquido nebulizado o un polvo seco desde un dispositivo adecuado. Para administración transmucosa o transdérmica, se utilizan agentes de penetración de barrera apropiados en la formulación. Dichos agentes de penetración son conocidos de forma general en la especialidad e incluyen por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede llevarse a cabo a través del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, se formulan los reactivos activos en pomadas, geles o cremas, tal como se conoce de forma general en la especialidad. Pueden prepararse los reactivos en forma de supositorios (p.ej., con bases para supositorio convencionales, como mantequilla de cacao u otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.
- En algunas realizaciones, se prepara un aptámero con un vehículo que lo protege contra la rápida eliminación desde el organismo. Por ejemplo, puede utilizarse una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulada. Pueden utilizarse polímeros biodegradables, biocompatibles, como vinil acetato de etileno, polianhídridos, poliácido glicólico, colágeno, poliortoésteres y poliácido láctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones serán evidentes para las personas especializadas en la técnica. Asimismo, es posible obtener los materiales de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc.
- Como vehículos farmacéuticamente aceptables, pueden utilizarse también suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales). Éstos se preparan de acuerdo con los métodos conocidos entre las personas especializadas en la técnica, como por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense No. 4.522.811.
- Por otra parte, pueden prepararse suspensiones de un aptámero, como puedan ser suspensiones para inyección oleosas apropiadas. Entre los disolventes o vehículos lipófilos adecuados se incluyen ácidos grasos, como aceite de sésamo o ésteres de ácido graso sintéticos, como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Pueden utilizarse asimismo polímeros amino policatiónicos que no son lípidos para la administración. Opcionalmente, la suspensión puede incluir también agentes o estabilizantes adecuados para aumentar la solubilidad de los compuestos y dar cabida a la preparación de soluciones muy concentradas.
- En algunos casos, puede ser especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en formas de dosis unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma de dosis unitaria, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto en tratamiento, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un aptámero calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosis unitaria de aptámeros que se describe en el presente documento está dictada y depende directamente de las características de un aptámero en particular y el efecto terapéutico en particular que se vaya a conseguir, así como las limitaciones inherentes propias de la especialidad de composición, tales como el agente

activo para el tratamiento de individuos.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un aptámero pueden incluir uno o más excipientes farmacéuticos. Entre los ejemplos de dichos excipientes se incluyen pero sin limitarse a ellos, agentes aglutinantes, agentes de carga, agentes lubricantes, agentes de suspensión, edulcorantes, agentes aromatizantes, conservantes, tampones, agentes de humectación, disgregantes, agentes efervescentes y otros excipientes. Dichos excipientes son conocidos en la especialidad. Entre los ejemplos de excipientes se incluyen: (1) agentes aglutinantes, que incluyen diversas celulosas, polivinil pirrolidona reticulada, celulosa microcristalina como Avicel PH101 y Avicel PHI 02, celulosa microcristalina silicificada (ProSolv SMCC™), goma de tragacanto y gelatina; (2) agentes de carga como diversos almidones, lactosa, monohidrato de lactosa y lactosa anhidra; (3) agentes disgregantes como ácido alginico, Primogel, almidón de maíz, polivinil pirrolidona ligeramente reticulada, almidón de patata, almidón de maíz y almidones modificados, croscarmelosa sódica, cross-povidona, glicolato de almidón sódico y mezclas de los mismos; (4) lubricantes, incluyendo agentes que actúan en la fluidez de un polvo que se va a comprimir y que incluyen estearato de magnesio, dióxido de sílice coloidal, como Aerosil 200, talco, ácido esteárico, estearato de calcio y gel de sílice; (5) deslizantes como dióxido de sílice coloidal; (6) conservantes, como sorbato potásico, metilparabeno, propil parabeno, ácido benzoico y sus sales, otros sales de ácido parahidroxibenzoico, como butilparabeno, alcoholes como alcohol etílico o bencilico, compuestos fenólicos como fenol y compuestos cuaternario como cloruro de benzalconio; (7) diluyentes como cargas inertes farmacéuticamente aceptables como celulosa microcristalina, lactosa, fosfato cálcico dibásico, sacáridos y/o mezclas de cualquiera de los enumerados; entre los ejemplos de diluyentes se incluyen celulosa microcristalina, como Avicel PH101 y Avicel PHI 02; lactosa como monohidrato de lactosa, lactosa anhidra y Pharmatose DCL21 ; fosfato cálcico dibásico, como Emcompress; manitol, almidón; sorbitol; sacarosa y glucosa; (8) agentes edulcorantes, incluyendo cualquier edulcorante natural o artificial, como sacarosa, sacarosa de sacarina, xilitol, sacarina sódico, ciclamato, aspartamo y acesulfamo; (9) agentes aromatizantes como pipermint, salicilato de metilo, aroma de naranja, Magnasweet (nombre comercial MAFCO), sabor de goma de mascar, aromas de fruta, y similares; y (10) agentes efervescentes, incluyendo pares efervescentes como ácido orgánico y un carbonato o bicarbonato. Entre los ácidos orgánicos adecuados se incluyen por ejemplo ácidos cítrico, tartárico, málico, fumárico, adípico, succínico y alginicos y anhídridos y sales de ácido. Entre los carbonatos y bicarbonatos adecuados se incluyen por ejemplo carbonato sódico, bicarbonato sódico, carbonato potásico, bicarbonato potásico, carbonato de magnesio, carbonato de glicina sódica, carbonato de L-lisina y carbonato de arginina. Alternativamente, puede estar presente solamente el componente de bicarbonato sódico en el par efervescente.

En varias realizaciones, las formulaciones descritas en el presente documento son sustancialmente puras. Tal como se utiliza en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que el principio activo (p.ej., un aptámero) es la especie presente predominante (es decir, sobre una base molar, es más abundante que las demás especies individuales en la composición. En algunas realizaciones, la fracción sustancialmente purificada es una composición en la que el principio activo comprende al menos un 50 por ciento (sobre la base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura incluirá más de aproximadamente un 80 % de todas las especies presentes en la composición. En varias realizaciones, una composición sustancialmente pura incluirá al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o al menos aproximadamente 99 % de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En diversas realizaciones, se purifica el principio activo a homogeneidad (no han de detectarse especies contaminantes en la composición a través de los métodos de detección convencionales), en el que la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

Kits que comprenden aptámeros

La presente divulgación proporciona kits que comprenden cualquiera de los aptámeros descritos en el presente documento. Dichos kits pueden comprender por ejemplo (1) al menos un aptámero; y (2) al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, como pueda ser un disolvente o solución. Los componentes de kit adicionales pueden incluir por ejemplo (1) cualquiera de los excipientes farmacéuticamente aceptables identificados en el presente documento, como por ejemplo estabilizantes, tampones, etc., (2) al menos un envase, vial o aparato similar para guardar y/o mezclar los componentes del kit; y (3) aparato de administración.

Métodos de tratamiento

La presente divulgación proporciona métodos de prevención o tratamiento (p.ej., alivio de uno o más síntomas) de afecciones médicas a través del uso de un aptámero descrito en el presente documento. Los métodos comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dichos aptámeros a un sujeto que lo necesita. Los aptámeros descritos pueden utilizarse también para terapia profiláctica. En algunas realizaciones, se administra el aptámero intravitrealmente. En algunas realizaciones se administra el aptámero por vía oral o intravenosa.

El aptámero utilizado en los métodos de tratamiento puede ser un aptámero descrito en el presente documento, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un profármaco del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de un profármaco del mismo.

El individuo o sujeto puede ser cualquier animal (doméstico, ganado o salvaje), incluyendo, pero sin limitarse a ellos, gatos, perros, caballos, cerdos y ganado, preferentemente seres humanos. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos paciente, individuo y sujeto pueden utilizarse indistintamente.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" describe la atención y asistencia a un paciente para tratar una enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de un aptámero para prevenir el inicio de los síntomas o complicaciones de una enfermedad, una afección o un trastorno; aliviar los síntomas o complicaciones de una enfermedad, afección o trastorno; o eliminar la presencia de la enfermedad, afección o trastorno en el paciente. Más específicamente, "tratamiento" incluye invertir, atenuar, aliviar, reducir al mínimo, suprimir o detener al
 10 menos un síntoma dañino del efecto de un estado patológico (trastorno), progresión de la enfermedad, agente causante de la enfermedad y otros estados anormales. El tratamiento se continúa por lo general hasta que mejoran los síntomas y/o la patología.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, "prevención" significa evitar total o en parte; mejorar o controlar; reducir, disminuir o hacer descender; o retardar o detener.

En varias realizaciones, las composiciones y los métodos divulgados se utilizan para tratar degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades autoinmunes, trastorno hematológicos, enfermedad infecciosas, septicemia, enfermedad inflamatorias o enfermedad neurodegenerativas.

20 En algunas realizaciones, los compuestos divulgados, o las sales farmacéuticamente aceptables o profármacos de los mismos, se pueden administrar en combinación con otros tratamientos que mejoran o erradican la patología, tal como se ha descrito. Las composiciones que incluyen los aptámeros divulgados pueden contener por ejemplo más de un aptámero. En algunos ejemplos, se administra una composición que contiene uno o más aptámeros en
 25 combinación con otro agente útil para el tratamiento de la enfermedad (p.ej., un agente útil para el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad, una enfermedad autoinmune, un trastorno hematológico, una enfermedad infecciosa, septicemia, una enfermedad inflamatoria o a enfermedad neurodegenerativa). En algunas realizaciones, serán adecuadas las formas farmacéuticas actualmente disponibles de los agentes terapéuticos conocidos para su uso en dichas combinaciones.

30 "Terapia de combinación" (o "co-terapia") incluye la administración de una composición de aptámero y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico para proporcionar el efecto beneficioso de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero sin limitarse a ellos, una acción conjunta farmacocinética o farmacodinámica que es el resultado de la combinación de agentes
 35 terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo normalmente a lo largo de un período de tiempo definido (normalmente, minutos, horas, días o semanas, dependiendo de la combinación seleccionada).

40 Puede pretenderse, aunque generalmente no, que "terapia de combinación" abarque la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapias por separado que tienen como resultado finalmente y de forma arbitraria combinaciones de la presente divulgación. Se pretende que "terapia de combinación" abarque la administración de estos agentes terapéuticos de forma secuencial, es decir, en la que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos o al
 45 menos dos de los agentes terapéuticos, de manera sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea se puede llevar a cabo por ejemplo administrando al sujeto una dosis única que tiene una relación fija de cada uno de los agentes terapéuticos en una única dosis o varias dosis para cada uno de los agentes terapéuticos.

50 La posología con la utilización de aptámeros se selecciona de acuerdo con diversos factores, incluyendo por ejemplo tipo, especie, edad, peso, género, estado médico del sujeto; gravedad de la afección que se va a tratar; ruta de administración; la función hepática y renal del sujeto y el aptámero o sales del mismo empleado en particular. Por lo general, un médico o veterinario especializado puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición requerida para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

55 En general, la dosis, es decir, la cantidad terapéuticamente eficaz oscila entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto que se está tratando, al día.

Los ejemplos que se exponen a continuación sirven para ilustrar determinadas características y/o realizaciones. No debe interpretarse que dichos ejemplos limitan la divulgación a las características y realizaciones que se describen en particular.

60 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1: Selección o identificación de aptámeros que tienen especificidad de unión a proteína C3

65 Este ejemplo proporciona el método representativo para la selección y producción de aptámeros de ADN para proteína C3 humana

Preparación de mezcla candidato

5 Se preparó una mezcla candidato de oligonucleótidos de ADNss aleatorizados parcialmente por extensión de la polimerasa de un cebador de ADNss hibridado con una matriz de ADNss biotinilada (se muestra en la Tabla 1 a continuación). La mezcla candidato contenía un casete aleatorizado de 40 nucleótidos que contenía dATP, dGTP, dCTP y 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina trifosfato (NapdUTP).

Tabla 1. Secuencias de matriz y cebadores

Designación de Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	SEQ ID NO:
Matriz 1	AB'AB'TTT TTT TTGTG TCT GTC TGT GTC CTC- (N) ₄₀ -GGAGTGGTAGAGGACTGG	1
Cebador 1	ATATATATCCAGTCCTCTACCACTCC	2
Cebador 2	AB'AB'TT TTT TTT GTG TCT GTC TGT GTC CTC	3
B' = biotina		

10 Se lavaron 5 ml de una suspensión espesa al 50 % de resina Streptavidin Plus UltraLink Resin (PIERCE) una vez con 2,5 ml de tampón SB18T0.05 (40 mM HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina- 1-etanesulfónico) ajustado a pH 7,5 con NaOH, 102 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 0,05% TWEEN 20) y tres veces con 2,5 ml de 16 mM NaCl. Se añadieron 20 nmoles de matriz 1 (SEQ ID NO: 1) que tenía dos restos biotina (designados como B' en la secuencia) y 40 posiciones aleatorizadas (designadas N₄₀ en la secuencia) a las perlas UltraLink SA lavadas y se
15 hicieron rotar a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, se lavaron las perlas tres veces con 16 mM NaCl. Entre lavado y lavado, se recuperaron las perlas por centrifugación. Se suspendieron las perlas, que contenía ahora la matriz capturada, en 1,25 ml de tampón de reacción de extensión [que contenía 24 nmoles de cebador (SEQ ID NO: 2), tampón IX SQ20 (120 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM KCl, 7 mM MgSO₄, 6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,001 % BSA y 0,1 % Triton X-100), 187,5 unidades de ADN polimerasa KOD XL (EMD MILLIPORE) y 0,5 mM de dATP, dCTP, dGTP y NapdUTP. Se dejó incubar las perlas a 68 °C durante 2 horas. A continuación, se lavaron las perlas tres veces con 16 mM NaCl. Se eluyó la biblioteca de aptámeros desde las perlas con 1 ml de 20 mM NaOH. La biblioteca eluida se neutralizó inmediatamente con 15 µl de 1N HCl y 10 µl HEPES pH 7,5 y 1 µl 10 % TWEEN-20. Se concentró la biblioteca con filtro AMICON Ultracel YM-10 a aproximadamente 0,2 ml y se determinó la concentración de la biblioteca por espectroscopia de absorción ultravioleta

25

Marcado de proteína diana para inmovilización

Marcado con Alexa488 de proteína diana

30 Se marcó proteína C3 humana sin marcar purificada desde suero normal (QUIDEL, número de catálogo A401) por acoplamiento covalente de Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes™) con aminas primarias. Se mezcló proteína C3 (263 pmol en 68 µl) con un exceso molar de 137 más de colorante reactivo Alexa Fluor® 488 y se dejó incubar la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se eliminó el marcador sin reaccionar utilizando una columna de centrifugación y desalinización Zeba™ (PIERCE) y se intercambió el tampón en SB18T0.05.

35

Marcado con biotina de proteína C3 humana

40 Se biotiniló proteína C3 humana sin marcar purificada desde suero normal (QUIDEL, número de catálogo A401) por acoplamiento covalente de NHS-PEO4-biotina (PIERCE, EZ-LinkNHS-PEG4-Biotina) con restos que contenían aminas primarias. Se mezcló la proteína (200 pmoles en 75 µl) con un exceso molar 7 veces mayor de NHS-PEG4-biotina y se dejó incubar la reacción a 4 °C durante 16 horas. Una vez completada la reacción, se intercambió el tampón y se eliminó NHS-PEG4-biotina sin reaccionar por ultrafiltración utilizando filtros YM3 (MILLIPORE). El tampón de intercambio fue SB18T0.05.

45

Inmovilización de Proteína diana

50 Se inmovilizó proteína diana marcada con Alexa-Fluor® 488 en perlas magnéticas de proteína G (Dynabeads®, LIFE TECHNOLOGIES o tal como se denominan en adelante perlas de proteína G) para la Ronda 1 a Ronda 4 del proceso SELEX. Se prepararon perlas revestidas con anticuerpo mezclando 10 mg de las perlas con 70 µg de IgG de conejo anti-Alexa Fluor® 488 (INVITROGEN, MOLECULAR PROBES, A11094) en 1 ml de tampón SB18T0.05. Se dejó incubar la mezcla a 37 °C durante 30 minutos. Para eliminar el anticuerpo sin unir, se lavaron tres veces las perlas con 14 ml de SB18T0.05. Finalmente, se suspendieron las perlas en 1 ml (10 mg/ml) de SB18T0.05 y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

55 Se inmovilizó la proteína diana marcada sobre perlas paramagnéticas de MIONE-SA (MYONE SA, INVITROGEN o denominadas en adelante perlas SA) para la Ronda 5 a Ronda 9 del proceso SELEX. Se prepararon perlas (50 mgs) lavando tres veces con 14 ml de SB18T0.05. Finalmente, se suspendieron las perlas a 10 mgs/ml en SB18T0.05 y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Selección de aptámero con proceso de enriquecimiento de constante de disociación lenta

Se completó un total de nueve rondas del proceso SELEX con selección en cuanto a la afinidad y la constante de disociación lenta. Antes de cada una de las rondas, se llevó a cabo una contra-selección para reducir la contaminación de fondo y reducir la probabilidad de obtener aptámeros con unión no específica a proteína. Las contra-selecciones se realizaron del siguiente modo:

Para la Ronda 1, se calentaron 100 μ l de mezcla candidato de ADN que contenía aproximadamente 1 nmol de ADN en SB18T0.05 a 95 °C durante 5 minutos y después se enfrió a 70 °C durante 5 minutos, a continuación a 48 °C durante 5 minutos y después se transfirió a un bloque a 37 °C durante 5 minutos. A continuación, se combinó la muestra con 10 μ l de mezcla competidora de proteína (0,1 % HSA, 10 μ M caseína y 10 μ M protrombina en SB18T0.05) y 1 mg (100 μ l) de perlas de proteína G y se incubó a 37 °C durante 10 minutos con mezclado. Se eliminaron las perlas por separación magnética.

Para las rondas 2-9, se mezclaron partes alícuotas de 65 μ l de la mezcla candidato de ADN obtenida en la ronda anterior (65 % de ADN obtenido de la ronda anterior) con 16 μ l de 5x SB18T0.05. Se calentó la mezcla a 95 °C durante 3 minutos y se enfrió a 37 °C a una velocidad de 0,1 °C /segundo. A continuación, se combinó la muestra con 9 μ l de mezcla competidora de proteína (0,1% HSA, 10 μ M caseína y 10 μ M protrombina en SB18T0.05) y 0,1 mg (10 μ l) de perlas de proteína G (Rondas 2-4) o Perlas SA (Rondas 5-9) y se incubó a 37 °C durante 10 minutos con mezclado. Se eliminaron las perlas por separación magnética.

Después de la primera contra-selección, se pre-inmovilizó la proteína diana sobre perlas de proteína G para el proceso de selección de la Ronda 1. Para llevarlo a cabo, se mezclaron 2 mg de perlas de proteína G con anticuerpo anti-Alexa Fluor® 488 inmovilizado con 50 pmoles de proteína diana marcada con Alexa-Fuor® 488 y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Se eliminó la diana sin unir por lavado de las perlas con SB18T0.05. Se añadió mezcla candidato de ADN contra-seleccionada (100 μ l) a las perlas y se incubó a 37 °C durante 60 minutos con mezclado. No se empleó ningún proceso de enriquecimiento de constante de disociación lenta en la Ronda 1 y simplemente se lavaron las perlas 5 veces con 100 μ l de SB18T0.05. Tras los lavados, se eluyó el aptámero de las perlas por adición de 170 μ l de 20 μ M NaOH y se incubó a 37 °C durante 5 minutos con mezclado. Se transfirió el eluato que contenía aptámero (165 μ l) a un tubo nuevo tras la separación magnética de las perlas y se neutralizó la solución por adición de 41 μ l de 25 mM Tris-HCl pH 7,5 que contenía 80 mM HCl.

Para las rondas 2-9, se llevaron a cabo selecciones con la mezcla candidato de ADN y proteína diana tal como se describe a continuación, al mismo tiempo que, de forma paralela, se llevaba a cabo una selección idéntica con la mezcla candidato de ADN, pero sin la proteína diana. La comparación de los valores Ct obtenidos de la PCR para la muestra con la proteína diana (señal S) y la muestra sin proteína diana (fondo B) fueron utilizados como guía para reducir la concentración de diana en la siguiente ronda. Cuando el valor delta Ct fue superior a 4, pero inferior a 8, se redujo la proteína diana a la tercera parte en la siguiente ronda. Cuando el valor delta Ct fue superior a 8, se redujo la diana a la 10 parte en la siguiente ronda.

Para la Ronda 2, se mezcló la proteína diana marcada (5 pmoles en 10 μ l) con 40 μ l de la mezcla candidato de ADN contra-seleccionada y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Se comenzó un proceso de enriquecimiento de constante de disociación lenta añadiendo 50 μ l de sulfato de dextrano 10 mM seguido de la adición inmediata de 0,2 mg de perlas de proteína G con anticuerpo anti-Alexa Fluor® 488 inmovilizado. Se dejó incubar durante 15 minutos a 37 °C con mezclado. Se lavaron las perlas una vez con 30 % de glicerol en SB18T0.05 y 5 veces con 100 μ l de SB18T0.05. Se eluyó la cadena del aptámero de las perlas por adición de 85 μ l de 20 mM NaOH y se incubó a 37 °C durante 5 minutos con mezclado. Se eliminaron las perlas por separación magnética y se transfirieron 80 μ l de eluato de aptámero a un nuevo tubo y se neutralizó con 20 μ l de una solución que consistió en 25 mM Tris-HCl pH 7.5 y 80 mM HCl. Se llevaron a cabo las Rondas 3 y 4 tal como se ha descrito para la Ronda 2 salvo que se añadió sulfato de dextrano 15 minutos antes de la adición de perlas de proteína G con anticuerpo anti-Alexa Fluor® 488 inmovilizado. Tampoco se realizó un lavado con glicerol.

Se realizaron las Rondas 5 a 9 utilizando proteína diana marcada con biotina. Para la Ronda 5, se mezcló la diana (1,6 pmoles en 10 μ l) se mezcló con 40 μ l de mezcla candidato de ADN contra-seleccionada y se incubó a 37 °C durante 15 minutos con mezclado. A continuación, se comenzó un proceso de enriquecimiento de constante de disociación lenta añadiendo 50 μ l de sulfato de dextrano 10 mM y se dejó incubar la mezcla durante 15 minutos más con mezclado. Se añadieron perlas SA (0,2 mg) para capturar complejos de la proteína diana aptámero (15 minutos de incubación a 37 °C con mezclado). A continuación, se lavaron las perlas 5 veces con 100 μ l de SB18T0.05. Se eluyeron los aptámeros unidos desde las perlas por adición de 85 μ l de 20 mM NaOH y se incubó a 37°C durante 5 minutos con mezclado. Se eliminaron las perlas por separación magnética y se transfirieron 80 μ l de eluato de aptámero a un nuevo tubo y se neutralizó con 20 μ l de una solución que consistió en 25 mM Tris-HCl pH 7,5 y 80 mM HCl.

Se llevó a cabo la Ronda 6 igual que la Ronda 5 salvo que se utilizó un desavío con dextrano de 30 minutos y se capturó la proteína diana marcada con 0,05 mg de Perlas SA. Se realizaron las Rondas 7 y 8 igual que la Ronda 6 salvo que se utilizaron solamente 0,16 pmoles de proteína diana. Se llevó a cabo la Ronda 9 del proceso SELEX

como la Ronda 8 salvo que se utilizaron solamente 0,05 pmoles de proteína diana.

Amplificación y purificación de aptámero

5 Se amplificó y cuantificó el ADN de aptámero seleccionado de cada Ronda por QPCR. Se añadieron 48 µl de ADN a 12 ml de mezcla de QPCR (10X tampón ADN polimerasa KOD; Novagen #71157, diluido a 5X, 25 mM MgCl₂, 5 µM cebador directo de PCR (Cebador 1, SEQ ID NO: 2), 5 µM cebador inverso de PCR biotinilado (Cebador 2, SEQ ID NO: 3), 5X Verde I SYBR, 0,075 U/µl ADN polimerasa KOD XL y 1 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y se cicló térmicamente en un instrumento A BIORAD MyIQ QPCR con el siguiente protocolo: 1 ciclo de 96 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 10 segundos y 69 °C durante 30 minutos; seguido de 30 ciclos de 96 °C durante 15 segundos, 69 °C durante 1 minuto. Se llevó a cabo la cuantificación con el software del instrumento y se comparó el número de copias de ADN seleccionadas con y sin proteína diana para determinar las relaciones señal/fondo.

15 Tras la amplificación, se capturó el producto de PCR sobre perlas SA a través de la cadena antisentido biotinilada. Se lavaron 1,25 ml de perlas SA (10 mg/ml) una vez con 14 ml de NaOH 20 mM, dos veces con 14 ml SB18T0.05, se resuspendieron en 1,25 ml 3 M NaCl + 0,05% TWEEN y se almacenaron a 4 °C. Se añadieron 25 µl Perlas SA (10 mg/ml en 3 M NaCl) a 50 µl de productos de QPCR bicatenarios y se incubó a 25 °C durante 15 minutos con mezclado. Se lavaron las perlas una vez con 16 mM NaCl y después se eluyó la cadena "sentido" desde las perlas añadiendo 100 µl 20 mM NaOH e incubando a 37 °C durante 1 minuto con mezclado. Se descartó la cadena eluida y se lavaron tres veces las perlas con SB18T0.05 y una vez con 16 mM NaCl.

25 Se preparó aptámero sentido que contenía NapdU por extensión de cebador desde la cadena antisentido inmovilizada. Se suspendieron las perlas en 40 µl de mezcla de reacción de extensión de cebador (1 x tampón de extensión de cebador (120 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM KCl, 7 mM MgSO₄, 6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% TRITON X-100 y 0,001 % albúmina de suero bovino), 3 µM cebador directo (Cebador 1, SEQ ID NO: 2), 0,5 mM de dATP, dCTP, dGTP y NapdUTP y 0.015 U/ml ADN polimerasa KOD XL) y se incubó a 68 °C durante 60 minutos con mezclado. Se lavaron las perlas tres veces con SB18T0.05 y se eluyó la cadena del aptámero desde las perlas por adición de 85 µl de 20 mM NaOH y se incubó a 37 °C durante 1 minute con mezclado. Se transfirieron 80 µl de aptámero a un nuevo tubo tras la separación magnética, se neutralizó con 20 µl de 80 mM HCl, tamponado con 5 µl de 0,1 M HEPES, pH 7,5.

Rigurosidad y retroalimentación de selección

35 Se redujo la concentración de proteína diana relativa de la etapa de selección cada Ronda como respuesta a la señal QPCR (ΔCt) Siguiendo la siguiente regla:

$$\text{Si } \Delta Ct < 4, [P]_{(i+1)} = [P]_{(i)}$$

$$40 \quad \text{Si } 4 \leq \Delta Ct < 8, [P]_{(i+1)} = [P]_{(i)} / 3,2$$

$$\text{Si } \Delta Ct \geq 8, [P]_{(i+1)} = [P]_{(i)} / 10$$

en la que [P] = concentración de proteína y i = Número de ronda actual.

45 Después de cada ronda de selección, se determinó el estado de convergencia de la mezcla de ADN enriquecida. Se diluyeron 10 µl de producto de QPCR de doble cadena hasta 200 µl con 4 mM MgCl₂ que contenía verde I IX de SYBR. Se analizaron las muestras en cuanto a la convergencia utilizando un análisis C_{0t} que mide el tiempo de hibridación para formar mezclas de complejo de oligonucleótidos de doble cadena. Se termociclaron las muestras con el siguiente protocolo: 3 ciclos de 98 °C durante 1 minuto, 85 °C durante 1 minuto; 2 ciclos de 98 °C durante 1 minuto, a continuación, 85 °C durante 30 minutos. Durante los 30 minutos a 85 °C, se midieron las imágenes fluorescentes a intervalos de 5 segundos. Se trazó un gráfico de la intensidad de fluorescencia en función del logaritmo del tiempo y se observó una mayor velocidad de hibridación con cada ronda de SELEX, indicando convergencia de secuencia.

55 Secuenciación de agrupamiento enriquecido e Identificación de aptámero

Tras nueve rondas del proceso SELEX, se secuenció el agrupamiento en convergencia. Se llevó a cabo la preparación de la secuencia del siguiente modo. Se amplificó el agrupamiento por PCR utilizando cebadores específicos de biblioteca SELEX que contenían una secuencia código de barras/índice única (identificador de secuencia único para cada agrupamiento). Se cuantificaron los productos de PCR individuales utilizando un ensayo de reactivo ADNs QuantiT™ PicoGreen® (LIFE TECHNOLOGIES), se combinaron a concentraciones equimolares y se concentraron/intercambio de tampón utilizando un dispositivo de filtración centrífuga AMICON Ultra-0.5 (MILLIPORE). A continuación, se purificó la mezcla por electroforesis de gel SDS-poliacrilamida (PAGE) y se concentró el eluato utilizando un dispositivo de filtración centrífuga Amicon Ultra-0.5 y se visualizó por PAGE para confirmar el tamaño, la pureza y el rendimiento de la mezcla final. Se entregó la mezcla a SeqWright Genomic Services (GE HEALTHCARE, Houston, TX) para secuenciación PGM por Ion Torrent. A partir de un agrupamiento

de secuencias que contenía más de 40.000 secuencias, se seleccionaron aleatoriamente 384 y se analizaron en cuanto a la convergencia utilizando un software adaptado que determina los recuentos de secuencia/número de copias e identifica los patrones de convergencia comunes utilizando un algoritmo de alineamiento local. Se seleccionan las secuencias con la mayor representación/número de copias en el agrupamiento y al menos una secuencia de cada patrón de convergencia para posterior caracterización. El patrón de convergencia 1 se identificó originalmente a partir de las secuencias 8491-3_3 (SEQ ID NO: 4), 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5), 8491-189_3 (SEQ ID NO: 8) y 8491-282_3 (SEQ ID NO: 9). Se utilizó el dominio de consenso derivado de estas cuatro secuencias para identificar otros miembros del patrón de convergencia 1 dentro de todo el agrupamiento de la secuencia de la Ronda 9 de más de 40.000 secuencias.

Síntesis de aptámero

Para determinar el potencial de unión e inhibidor, se prepararon aptámeros individuales por síntesis en fase sólida. Se preparó el reactivo de desoxiuridina-5-carboxamida amidita modificado utilizado para la síntesis en fase sólida por: condensación de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-5-trifluoroetoxicarbonil-2'-desoxiuridina (Nomura et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25:2784) con la amina primaria apropiada [1-naftilmetilamina] (RNH₂, 1,2 eq.; Et₃N, 3 eq.; acetonitrilo; 60 °C; 4h); 3'-O-fotitilación con 2-cianoetil-N,N-diisopropilclorofosforamidita (1,2 eq.; iPr₂EtN, 3 eq.; CH₂Cl₂; -10 a 0 °C; 4 h); y purificación por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice neutro. (Still, et al. (1978) J. Org. Chem. 43:2923). Se prepararon aptámeros por síntesis en fase sólida utilizando el método de fosforamidita (Beaucage y Caruthers (1981) Tetrahedron Lett. 22:1859) con algunos ajustes en el protocolo para tener en cuenta las modificaciones de base única descritas en el presente documento. Se llevó a cabo la destitilación con 10 % de ácido dicloroacético en tolueno durante 45 segundos; se completó el acoplamiento con 0,1 M fosforamiditas en 1:1 acetonitrilo: diclorometano activado por 5-bencilmercaptotetrazol y se dejó reaccionar 3 veces durante 5 minutos; se llevaron a cabo el sellado y la oxidación de acuerdo con las recomendaciones del vendedor del instrumento. Se llevó a efecto la desprotección con amoníaco gaseoso o metilamina en condiciones de presión, tiempo y temperatura optimizados en un reactor de acero inoxidable Parr. Se eluyeron los productos con agua desionizada en placas de 96 pocillos adecuadas, con muestreo estadístico ($\sqrt{N} + 1$) para caracterización LCMS, se cuantificó por espectrofotometría de UV y se analizó en cuanto a la afinidad de unión de proteína en solución acuosa tamponada.

Ejemplo 2: Constante de unión en equilibrio (K_d) para aptámeros a proteína C3

En este ejemplo se proporciona el método utilizado en el presente documento para medir afinidades de unión de aptámero –proteína C3 y determinar K_d . Brevemente, se calentó aptámero de ADN radiomarcado (³²P) durante 3 minutos a 95 °C en tampón SB18T0.01 (40 mM HEPES, pH 7,5, 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,01 % TWEEN-20) y se enfrió lentamente a 37 °C. Se formaron complejos mezclando ADN radiomarcado a aproximadamente 1×10^{-11} M con proteína C3 recombinante a concentraciones de 1×10^{-7} M a 1×10^{-12} M en tampón SB18T0.01 en un volumen de reacción de 60 μ l e incubando a 37 °C durante 60 minutos. Se transfirió una porción de cada reacción (5 μ l) a una membrana de nilón y se secó para determinar el recuento total en cada reacción. Se capturaron los complejos en resina ZORBAX (30 ng/ μ l, AGILENT), se pasó a través de una placa de HV multi-pantalla (MILLIPORE) al vacío y se lavó con 180 μ l de tampón SB18T0.01 para separar complejos de unión a proteína de ADN sin unir. Se obtuvieron imágenes de la membrana de nilón y la placa HV multi-pantalla con un FUJI FLA-3000 fosforimager® y se cuantificó la cantidad de radioactividad en cada muestra utilizando un software de análisis ImageQuant™. Se trazó en gráfico la fracción de ADN capturado en función de la concentración de proteína C3 (P_t) y se determinaron las constantes de unión en equilibrio (K_d) utilizando la siguiente fórmula: $y = (\max - \min) (P_t) / (K_d + P_t) + \min$.

Como ejemplo ilustrado, en la Figura 2 se muestra un gráfico en el que se representan las curvas de unión a proteína C3 humana. Aptámeros de ADN 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5), 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58) y 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125) se unen a proteína C3 con una K_d de $3,13 \times 10^{-11}$ M, $3,34 \times 10^{-11}$ M y $5,49 \times 10^{-11}$ M, respectivamente. La Figura 3 presenta un gráfico en el que se representa la unión de los aptámeros 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58) y 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125) a proteína C5 humana. NO se detecta unión aparente a proteína C5 humana lo que ilustra la especificidad de estos aptámeros para la proteína C3.

En la Tabla 2 se muestran secuencias de aptámero y afinidad para C3 de miembros del patrón de convergencia 1.

Tabla 2: Secuencias representativas de patrón de convergencia 1. Se muestran las secuencias en convergencia en la región aleatoria. Todas las secuencias contienen también 5 bases de cebadores 5'- y 3' (no se muestra) así como una desoxitimidina unida a 3'-3' en el término 3'- (no se muestra).

Aptámero No.	ID.	Secuencia (5' → 3')	K_d (M)	SEQ ID NO.
8491-3_3		G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-G-G-C-C-G-G-G-C-A-G-G-G	1.19e-10	4
8491-94_3		C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G	3.13e-11	5

ES 2 664 179 T3

8491-389_3	A-P-G-P-C-G-G-C-G-P-P-P-G-G-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-A-C-G-C-G-P	2.95e-11	6
8491-390_3	P-A-C-A-A-A-G-C-G-A-P-P-G-G-C-P-C-G-A-P-A-G-P-C-A-G-P-A-C-G-P-P-P-C-P-C-G-C-P-C	4.12e-10	7
8491-189_3	A-G-A-C-P-G-P-A-G-P-P-G-A-C-P-C-C-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-A-C-A-C-A-P-P-G	3.35e-11	8
8491-282_3	P-A-C-G-G-P-P-G-G-C-P-C-C-A-P-A-G-P-C-A-G-P-A-C-G-P-P-P-A-C-G-A-P-A-C-C-C-C	2.70e-10	9
8491-395_3	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-G-G-C-C-G-G-G-C-A-G-G-G	3.52e-9	10
8491-394_3	C-P-P-A-A-A-A-G-G-G-P-C-G-P-P-G-A-C-P-C-C-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-C-C-G-A	4.48e-10	11
8491-397_3	G-P-C-P-G-G-C-P-A-A-C-P-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-G-P-G-A-G-C-G-P-G-A-P-P-A-P	3.11e-9	12
8491-396_3	P-G-P-P-G-A-C-P-C-A-C-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-A-C-G-G-C-A-A-P-A-G-C-A-C-A	3.11e-10	13
8491-393_3	G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-G-G-C-C-C-G-P-P-C-A-C-A-A-G	2.5e-10	14
8491-406_3	G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-P-G-A-A-C-G-P-G	2.47e-9	15
8491-387_3	C-P-A-A-C-A-C-G-G-C-C-G-A-G-P-P-G-A-C-P-C-C-C-A-P-A-G-P-C-C-G-P A-C-G-P-P-P-G-C	5.19e-10	16
8491-405_3	A-P-G-P-C-G-G-C-G-P-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-G-G-C-C-G-G-G-C-A-G-G-G	1.59e-10	17
8491-388_3	A-C-G-G-P-G-A-C-P-C-C-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-C-G-G-A-C-G-C-A-C-C	7.1e-10	18
8491-403_3	G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-P-P-P-G-G-G-C-C-G-G-G-G-G-G-C-A-G	1.53-10	19
8491-385_3	G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-P-P-G-A-C-C-G-G-G-G-C-A-G-G-G-G	1.46-10	20
8491-407_3	G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-P-A-C-G-C-G-P	2.08e-10	21
8491-402_3	P-C-C-C-A-C-A-C-G-A-C-G-A-A-P-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-P-A	7.39e-11	22
8491-408_3	C-A-A-G-C-C-P-C-P-C-G-G-P-P-P-G-G-C-P-A-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-P-C-A-C	1.61e-10	23
8491-400_3	P-P-G-A-C-P-C-G-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-G-C-G-G-A-A-P-A-C-C-A-G-C-P-G-A-C	1.20e-9	24
8491-404_3	G-A-G-C-P-P-P-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-P-P-P-G-G-C-C-G-G-G-C-A-G-G-G	1.85e-10	25
8491-386_3	A-G-C-A-A-C-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-A-P-G-C-G-A-G-A-A-C-A	1.04e-10	26
8491-399_3	C-P-A-P-G-A-G-G-G-C-P-G-A-P-P-C-A-A-P-A-G-P-C-A-G-P-A-C-G-P-P-C-G-C-C-C-A-P-C	8.61e-9	27
8491-409_3	P-C-C-C-P-P-P-G-G-C-P-C-G-A-P-A-G-P-C-G-G-P-A-C-G-P-P-P-P-G-G-G-A-G-G-C-G-P-G	3.16e-10	28

8491-401_3	G-A-G-P-A-C-P-P-C-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-P- A-C-G-P-P-P-G-G-C-C-G-G-C-A-G-G-C	NB	29
8491-398_3	C-G-P-G-A-C-P-C-G-A-P-G-A-G-P-C-A-P-A-G-P-C-G-G-P- P-C-C-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G	NB	30
P-NapdU NB-Sin unión			

Ejemplo 3: Inhibición de hemólisis mediada por el complemento

Este ejemplo proporciona el método utilizado en el presente documento para medir la inhibición de aptámero de hemólisis mediada por complemento de células de glóbulos rojos de oveja revestidos con anticuerpo. Se mezcla una dilución 1:20 de suero humano desprovisto de proteína C3 (COMPLEMENT TECHNOLOGIES número de catálogo A314) con proteína C3 humana 20 a 25 nm (tal como se indica) y eritrocitos de oveja revestidos con anticuerpo (7×10^7 células/ml) COMPLEMENT TECHNOLOGIES número de catálogo B200) con o sin aptámero, a la concentración final indicada. Se incluyen también las muestras de control sin adición de aptámeros o sin adición de proteína C3 y aptámeros junto con el control positivo en el que se lisaron todos los eritrocitos. Se diluyeron las muestras y se llevó a cabo el ensayo en un volumen total de 0,075 ml en tampón de gelatina veronal (GVB++; 0,1 % gelatina, 0,15 mM cloruro de calcio, 0,5 mM cloruro de magnesio 5 mM Veronal, 145 mM NaCl, 0,025 % NaN_3 , pH 7,3, COMPLEMENT TECHNOLOGIES número de catálogo B102) y se incubó durante 30 min a 37 °C. Se centrifugaron las muestras (200 x g durante 10 minutos) y se midió la absorbancia del sobrenadante a 412 nm seguido de dilución 1 en 4 en tampón GVB⁺⁺. En la Figura 4 y la Figura 5 se muestra la capacidad de aptámeros del patrón de convergencia 1 de inhibir hemólisis mediada por el complemento.

Se observó que aptámeros del patrón de convergencia tenía las propiedades de unión de alta afinidad (Tabla 2) e inhibición (Figura 4). Se identificaron veintisiete secuencias independientes dentro de este patrón a partir del agrupamiento de secuencia original de más de 40.000 secuencias. Se analizaron las 27 secuencias para unión de la proteína C3 humana. Se observó que 25 eran proteínas C3 humanas con una alta afinidad (Tabla 2). Se analizaron también veinte de estas secuencias en cuanto a su capacidad para inhibir la hemólisis mediada por el complemento de glóbulos rojos de oveja revestidos con anticuerpo (Figura 4). Los 18 aptámeros que fueron inhibidores fuertes en el ensayo hemolítico fueron aquellos que se unieron a la proteína C3 con alta afinidad. Los que no se unieron a la proteína C3 no fueron inhibidores (< 25 % de inhibición). Como otros controles, se analizaron dos secuencias en cuanto a la unión a proteína C3 y en cuanto a la inhibición de proteína C3 en la que se ha reemplazado un solo nucleótido modificado NapdU dentro de la secuencia 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5) con un nucleótido desoxitimidina. Estas dos secuencias, 8491-94_14 (SEQ ID NO: 35) y 8491-94_15 (SEQ ID NO: 36), no se unieron a la proteína C3 con alta afinidad (véase Tabla 3 más adelante) o inhiben hemólisis (Figura 4). Estos datos indican que se requiere una unión de alta afinidad a la proteína C3 para las propiedades de inhibición observada y que los nucleótidos NapdU modificados contribuyen sustancialmente a la afinidad de unión global.

Después de excluir dos secuencias que, según se demostró, no se unieron a proteína C3, se alinearon las 25 secuencias restantes para revelar el dominio de consenso de 23 nucleótidos de longitud (Figura 1). El número de veces que se identificó cada secuencia se muestra en esta Figura. Las secuencias con más de 5 diferencias de nucleótido con respecto a cualquier otra secuencia fueron consideradas como secuencias seleccionadas independientemente. Las secuencias con diferencias de 1 a 5 nucleótidos con respecto a cualquier secuencia específica mostrada en la Figura 1 se incluyen en el recuento de secuencia total para esa secuencia. Este dominio se caracteriza por tener una base (P) NapdU conservada en las posiciones 2, 6, 10, 13, 17, 21 y 22. La posición 1 fue P en 20 de las 25 secuencias, una guanina (G) en 3 secuencias [8491-94_3 (SEQ ID NO: 5), 8491-395_3 (SEQ ID NO: 10) y 8491-388_3 (SEQ ID NO: 18)] y una citosina (C) en dos secuencias [8491-397 (SEQ ID NO: 12) y 8491-399 (SEQ ID NO: 27)]. La posición 3 es G mientras que la posición 4 es una base purina cuando A se da 19 veces y G se da 6 veces. La posición 5 es C en todas salvo una secuencia [8491-399_3 (SEQ ID NO: 27)], en la que es P. La posición 7 es C en 23 de las secuencias y A en dos secuencias [8491-397_3 (SEQ ID NO: 12) y 8499-408_3 (SEQ ID NO: 23)]. La posición 8 es A en 17 secuencias de las 25 secuencias en consideración, C en 5 secuencias y G en 3 secuencias. Se observa una sola inserción de base (C o A) dentro del motivo de consenso entre las posiciones 8 y 9 en 4 secuencias [8491-387 (SEQ ID NO: 16), 8491-396 (SEQ ID NO: 13), 8491-397 (SEQ ID NO: 12) y 8491-404 (SEQ ID NO: 25)]. La posición 9 es A salvo en dos secuencias [8491-404 (SEQ ID NO: 25) y 8491-397 (SEQ ID NO: 12)] en la que es P. Se demostró que una de estas secuencias se unió a proteína C3 con un K_d de 3,1 nM [8491-397_3 (SEQ ID NO: 12)]. Las posiciones 10-14 se conservan absolutamente con la secuencia 5'-P-A-G-P-C-3' (SEQ ID NO: 132). La posición 15 es C salvo en tres secuencias en las que es A [8491-390_3 (SEQ ID NO: 7), 8491-282_3 (SEQ ID NO: 9) y 8491-399_3 (SEQ ID NO: 27)] y una secuencia en la que es G [8491-409_3 (SEQ ID NO: 28)]. Las posiciones 16-22 se conservan en su totalidad en las secuencias que se unen a proteína C3. Estas posiciones contienen la secuencia 5'-G-P-A-C-G-P-P-3' (SEQ ID NO: 133). De las 25 secuencias en consideración, la posición 23 es P en 20 casos pero es en 5 casos.

De estos inhibidores de alta afinidad de proteína C3 humana, se seleccionó la secuencia 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5) para modificación post-SELEX para identificar mejores propiedades y características. Tal como se muestra en la Figura 5A, esta secuencia podría inhibir la hemólisis de glóbulos rojos de oveja revestidos con anticuerpo en este sistema con una IC₅₀ de 14,8 nM.

5

Ejemplo 4: Inhibición de liberación de C3a

Este ejemplo proporciona el método utilizado en el presente documento para medir la capacidad de un aptámero para prevenir la escisión proteolítica de proteína C3 en C3a y C3b y por tanto, impedir la activación de proteína C3 humana. Los más importante del ensayo es iniciar la ruta alternativa del sistema del complemento en suero humano con cimosano pre-activado (COMPLEMENT TECHNOLOGIES número de catálogo B400) en presencia o ausencia de un aptámero. Cuando se inicia la ruta, se libera C3a y a continuación, se metaboliza rápidamente en C3a desArg mediante endopeptidasa ya presente en el suero. A continuación, se mide la cantidad relativa de C3a desArg utilizando el kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima C3a (ELISA) humana DB OptEIA™ (BD BIOSCIENCES, San Diego, CA número de catálogo 550499) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se diluye suero humano normal (COMPLEMENT TECHNOLOGIES (número de catálogo NHS) a 10 % o 34 % en tampón de gelatina (0,1 % gelatina, 5 mM Veronal, 145 mM NaCl, 0,025 % NaN₃, pH 7,3, COMPLEMENT TECHNOLOGIES número de catálogo B101) que contiene 10 nM EGTA magnesio (COMPLEMENT TECHNOLOGIS número de catálogo B106) con y sin la adición de un aptámero a una concentración determinada. Se inició la cascada del complemento por adición de cimosano-A (0,5 mg/ml) y se dejó proseguir la cascada del complemento durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se separó cimosano-A de la solución por centrifugación (7.000 x g durante 4 minutos) a temperatura ambiente y se diluyó la muestra apropiadamente para la medición con un kit de ELISA de C3a humana. Como control para la posibilidad de interferencia del aptámero con el rendimiento de ELISA C3a desArg, se añaden aptámeros al cabo de 30 minutos de la reacción. En la Figura 12 A se muestra la capacidad del patrón de convergencia representativo secuencias 8491-3_3 (SEQ ID NO: 4), (8491-94_3 (SEQ ID NO: 5), 8491-189_3 (SEQ ID NO: 8), 8491-387_3 (SEQ ID NO: 16) y 8491-389_3 (SEQ ID NO: 6) de inhibir la liberación de C3a tras la activación del complemento inducida por cimosano-A. Tal como se muestra en la Figura 12B, la inhibición observada no se debe a la interferencia de aptámero del sistema de detección de C3a (C3a desArg ELISA). En este control, se añade el aptámero después del proceso de la cascada de complemento de manera que el aptámero está presente en la misma concentración de en el experimento de inhibición correspondiente que se presenta en la Figura 12 A. En la Figura 6, se muestra que el elemento de patrón 1, 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5), inhibe la liberación de C3a en suero humano normal al 34 % con una IC₅₀ de 2 mM.

35

Sustitución de desoxitimidina por NapdU en 8491-94_3 (50-meros)

Se llevó a cabo el recorrido de desoxitimidina (dT) en 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5). Se sustituyó una sola dT por una de las ocho posiciones que contenían un nucleótido modificado (NapdU). Recorrido de dT significa determinar la contribución de cada nucleótido modificado a la unión de alta afinidad. Los nucleótidos modificados no requeridos para la unión de alta afinidad podrían sustituirse potencialmente por una base no modificada o suprimida. En esta Tabla, "P" representa NapdU, mientras que A, T, C y G representa los desoxirribonucleótidos de origen natural y "NB" representa la falta de unión de hasta 100 nM de proteína C3 humana. Los resultados de estos recorridos se muestran en la Tabla 4. La sustitución para los primeros siete nucleótidos modificados (los más próximos al término 5') disminuyó la afinidad para la proteína C3 en relación con los 50 meros sin ninguna sustitución. La sustitución de NapdU más próximo al término 3' no influyó significativamente en la unión.

45

Tabla 3. Sustituciones de desoxitimidina (T) por bases modificadas (P) en el 50-mero 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5). Todas las secuencias contienen desoxitimidina unida 3'-3' en el término 3' (no se muestra).

Aptámero ID. No.	Secuencia (5'→ 3')	K _d (M)	SEQ ID NO.
8491-94_11	A-C-T-C-C-C-C-G-G-T-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P- A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G- A	2.95e-08	32
8491-94_12	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-T-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P- A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G- A	8.57e-09	33
8491-94_13	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-T-A-G-P-C-C-G-P- A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G- A	4.17e-08	34

8491-94_14	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-T-C-C-G-P- A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G- A	1.00e-06	35
8491-94_15	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-T- A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G- A	1.00e-06	36
8491-94_16	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P- A-C-G-T-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G- A	6.94e-08	37
8491-94_17	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P- A-C-G-P-T-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G- A	2.88e-09	38
8491-94_18	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P- A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-T-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G- A	4.21e-11	39

Truncamiento de 50-mero 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5)

5 Se seleccionó la secuencia 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5) para modificación post-SELEX y análisis y ha sido truncada para 28-mero 8491-94_53 de (SEQ ID NO: 58) en una serie de experimentos de supresión (Tabla 4). La secuencia truncada mantiene una alta afinidad para la proteína C3 humana y sigue conteniendo el motivo de consenso de 23 nucleótidos, tal como se ha descrito. Se elimina el nucleótido modificado que no contribuyó significativamente a la unión de alta afinidad tal como se ha demostrado en estos 28-mero. Se analizaron también los truncamientos representativos en cuanto a su capacidad para inhibir la proteína C3 en el ensayo hemolítico realizado con suero humano desprovisto de C3 reforzado con 20 nM (concentración final) proteína C3 (Figura 5). 8491-94_26 (SEQ ID NO: 54), 8491-94_27 (SEQ ID NO: 55) y 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58) fueron capaces de inhibir la hemólisis con valores IC₅₀ de 15,1 nM 24,6 nM y 17,1 nM, respectivamente. Se demostró también que el truncado de 28-meros, 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58), inhibió la liberación de C3a en suero humano normal 34 % con una IC₅₀ de 1,5 mM (Figura 6).

15 Tabla 4: Truncamientos en la secuencia de 50-meros 8491-94_3 (SEQ ID NO: 5). Todas las secuencias contienen una desoxitimidina unida 3'-3' en el término 3' (no se muestra)

Aptámero ID. No	Secuencia (5'→3')	K _d	SEQ ID NO.
8491-94_4	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G- P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A	2.91e-11	40
8491-94_5	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G- P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C	2.98e-11	41
8491-94_6	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G- P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A	1.90e-11	42
8491-94_7	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G- P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C	1.94e-11	43
8491-94_8	C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C- G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	3.69e-11	44
8491-94_9	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P- C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	2.43e-10	45
8491-94_10	P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C- G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	7.60e-09	46

8491-94_19	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	5.59E-11	47
8491-94_20	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C	1.14e-09	48
8491-94_21	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P	2.49e-10	49
8491-94_22	C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	1.03e-10	50
8491-94_23	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	6.21e-11	51
8491-94_24	C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C	5.35e-11	52
8491-94_25	C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	9.28e-11	53
8491-94_26	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	5.11e-11	54
8491-94_27	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	6.58e-11	55
8491-94_28	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C	2.65e-10	56
8491-94_29	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	5.81e-11	57
8491-94_53	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	3.34e-11	58
8491-94_87	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-G	1.54e-10	59

Sustituciones únicas de espaciador C3 en 8491-94_26 (SEQ ID NO: 54)

5 La primera ronda de modificaciones post-SELEX del aptámero C3 fue un recorrido de espaciador C3 en todas las posiciones del 30-mero 8491-94_26 (SEQ ID NO: 54)) salvo para las posiciones que contenían un NapdU. El recorrido del espaciador C3 sirve para identificar bases no requeridas para la unión de alta afinidad que podrían eliminarse completamente, reemplazarse con un espaciador de 3 carbonos (espaciador C3) u otros engarces como hexaetilén glicol (Heg) o engarces de polietilén glicol (PEG). Los resultados para la sustitución de los espaciadores C3 se muestra en la Tabla 5. En esta Tabla, "P" representa NapdU, "C3" representa espaciador C3; A, C y G representan los desoxirribonucleótidos de origen natural y "NB" representa falta de unión de hasta 100 nM proteína C3. Varios sitios toleraron una sustitución de espaciador C3. La sustitución de un espaciador C3 en la posición interna del árbol presentó una potenciación de la unión de proteína C3 en comparación con 8491-94_26 (SEQ ID NO: 54). Fueron las posiciones 8, 18 y 26 en relación con el término 5' de 8491-94_26 (SEQ ID NO: 54). La sustitución en la posición 8 creó el aptámero 8491-94_36 (SEQ ID NO: 66) que se unió a la proteína C3 con una constante de disociación de afinidad (K_d) de 31,5 pM al mismo tiempo que la sustitución en la posición 18 o 26 creó los aptámeros 8491-94_43 (SEQ ID NO: 73) y [8491-94_48 (SEQ ID NO: 78)], respectivamente, que se unió a proteína C3 con valores K_d de 14,2 pM y 30,2 pM, respectivamente.

20 Se realizaron una única sustitución de Heg o espaciador C3 ("C3") o sustitución de múltiples espaciadores C3 en la posición equivalente en el aptámero de 28 meros 8491-94_53 (Tabla 6). Ha de señalarse que la sustitución de los grupos C3 del espaciador en árbol en las posiciones 7, 17 y 25 (números en relación con el término 50 de 8491-94_53) lleva a un aptámero con una K_d de 22,1 pM en comparación con 33,4 pM durante 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58).

25 Las secuencias individuales que contienen grupos espaciador C3 mantuvieron la capacidad de inhibir la proteína C3 en el ensayo de hemólisis (Figura 5). Secuencias 8491-94_30 (SEQ ID NO: 60), 8491-94_36 (SEQ ID NO: 66),

ES 2 664 179 T3

8491-94_37 (SEQ ID NO: 67) y 8491-94_43 (SEQ ID NO: 73) fueron capaces de inhibir la hemólisis en este ensayo con valores IC₅₀ de 20,9 nM 25,0 nM, 24,7 y 19,2 nM, respectivamente.

5

Tabla 5. Sustitución de espaciador C3 en 30-meor 8491-94_26 (SEQ ID NO: 54). Todas las secuencias contienen una desoxitimidina unida 3'-3' en el término 3' (no se muestra)

Aptámero ID. No.	Secuencia (5' → 3')	K _d (M)	SEQ ID NO.
8491-94_30	C3-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	6.22e-11	60
8491-94_31	C-C3-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	1.4e-10	61
8491-94_32	C-C-C3-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	7.8e-10	62
8491-94_33	C-C-G-C3-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	2.45e-10	63
8491-94_34	C-C-G-G-P-C3-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	1.41e-8	64
8491-94_35	C-C-G-G-P-G-C3-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	5.67e-9	65
8491-94_36	C-C-G-G-P-G-A-C3-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	3.15e-11	66
8491-94_37	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C3-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	9.22e-11	67
8491-94_38	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-C3-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	1.48e-10	68
8491-94_39	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-C3-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	3.10e-10	69
8491-94_40	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-C3-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	1.99e-9	70
8491-94_41	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-C3-P-C-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	5.98e-10	71
8491-94_42	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C3-C-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	8.60e-10	72
8491-94_43	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C3-G-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	1.42e-11	73
8491-94_44	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-C3-P-A-C-G-P- P-C-C-C-G-G	1.28e-9	74
8491-94_45	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-C3-C-G-P- P-C-C-C-G-G	2.28e-7	75
8491-94_46	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C3-G-P- P-C-C-C-G-G	NB	76
8491-94_47	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-C3-P- P-C-C-C-G-G	NB	77
8491-94_48	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P- C3-C-C-G-G	3.02e-11	78
8491-94_49	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P- C-C3-C-G-G	2.66e-10	79
8491-94_50	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P- C-C-C3-G-G	4.48e-10	80
8491-94_51	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P- C-C-C-C3-G	2.27e-10	81
8491-94_52	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P- C-C-C-G-C3	5.04e-11	82

Tabla 6. Sustituciones de espaciador C3 y espaciador hexaetilen glicol (Heg) en el 28-mero 8491-94_53. Todas las secuencias contienen desoxitimidina unida 3'-3' en el término 3' (no se muestra).

Aptámero ID. No.	Secuencia (5'→ 3')	K_d (M)	SEQ ID NO.
8491-94_54	C-G-G-P-G-A-C3-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C3-G-P-A-C-G-P-P-C3-C-C-G	2.21E-11	83
8491-94_55	C-G-G-P-G-A-C3-P-C3-A-A-P-A-G-P-C-C3-G-P-A-C-G-P-P-C3-C-C-G	4.15E-11	84
8491-94_56	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C3-G-P-A-C-G-P-P-C3-C-C-G	4.64E-11	85
8491-94_57	C-G-G-P-G-A-C-P-Heg-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	2.45E-10	86
8491-94_58	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C3-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	7.87E-10	87

Sustituciones simples de 2'-O-metilo en 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58).

5 Para mejorar la resistencia a la nucleasa del aptámero modificado con una constante de disociación lenta que contiene NapdU (SOMAmerno) 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58), se incorporaron grupos 2'-O-metilo (2'-OMe) en las posiciones de nucleótido no afectadas significativamente por la unión de proteína C3. El efecto de la unión de proteína en cualquier adición de 2'-OMe individual no es predecible a priori. Por lo tanto, se realizó el "recorrido 2'-OMe" en el que se crearon diversas variantes de aptámero 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58) en las que cada variante contenía solamente un único nucleótido modificado. Se determinó la afinidad de unión de cada variante (Secuencia ID Números 88 a 115).

15 Se realizaron sustituciones de 2'-O-metilo para identificar posiciones que pudieron tolerar esta sustitución resistente a la nucleasa. En la Tabla 7 se muestran secuencias y las afinidades de unión de cada construcción. En esta tabla el superíndice 1⁽¹⁾ representa un nucleótido con una sustitución 2'-O-metilo, "P" representa NapdU, "A", "C" y "G" representa las nucleobases de origen natural y "NB" representa ausencia de unión de hasta 100 nM human proteína C3. Se puede realizar una sustitución en 18 posiciones al mismo tiempo que se mantenía una K_d por debajo de 100 pM.

Tabla 7. Sustituciones de desoxitimidina y 2'-O-metilo en 28-mero 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58). Todas las secuencias contienen desoxitimidina unida 3'-3' en el término 3' (no se muestra)

Aptámero ID. No.	Secuencia (5'→ 3')	K_d (M)	SEQ ID NO.
8491-94_59	C ¹ -G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	3.42e-11	88
8491-94_60	C-G ¹ -G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	5.37e-11	89
8491-94_61	C-G-G ¹ -P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	2.37e-11	90
8491-94_62	C-G-G-P ¹ -G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	9.18e-11	91
8491-94_63	C-G-G-P-G ¹ -A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	2.68e-11	92
8491-94_64	C-G-G-P-G-A ¹ -C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	5.12e-10	93
8491-94_65	C-G-G-P-G-A-C ¹ -P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	3.16e-11	94
8491-94_66	C-G-G-P-G-A-C-P ¹ -C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	1.49e-10	95
8491-94_67	C-G-G-P-G-A-C-P-C ¹ -A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	6.99e-11	96
8491-94_68	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A ¹ -A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	4.24e-11	97

8491-94_69	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A ¹ -P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C- C-C-G	2.72e-10	98
8491-94_70	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P ¹ -A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C- C-C-G	3.38e-10	99
8491-94_71	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C- C-C-G	2.56e-11	100
8491-94_72	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G ¹ -P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C- C-C-G	6.17e-09	101
8491-94_73	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P ¹ -C-C-G-P-A-C-G-P-P-C- C-C-G	1.32e-09	102
8491-94_74	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C ¹ -C-G-P-A-C-G-P-P-C- C-C-G	1.92e-10	103
8491-94_75	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C ¹ -G-P-A-C-G-P-P-C- C-C-G	2.14e-10	104
8491-94_76	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G ¹ -P-A-C-G-P-P-C- C-C-G	9.30e-10	105
8491-94_77	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P ¹ -A-C-G-P-P-C- C-C-G	2.62e-11	106
8491-94_78	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A ¹ -C-G-P-P-C- C-C-G	7.18e-11	107
8491-94_79	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C ¹ -G-P-P-C- C-C-G	2.73e-10	108
8491-94_80	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G ¹ -P-P-C- C-C-G	6.78e-11	109
8491-94_81	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P ¹ -P-C- C-C-G	2.43e-11	110
8491-94_82	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P ¹ -C- C-C-G	1.18e-11	111
8491-94_83	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C ¹ - C-C-G	4.88e-11	112
8491-94_84	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C- C ¹ -C-G	7.38e-11	113
8491-94_85	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C- C-C ¹ -G	5.24e-11	114
8491-94_86	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C- C-C-G ¹	3.44e-11	115

Sustituciones múltiples de 2'-O-metiloo sustituciones múltiples de 2'-O-metilo con sustituciones de espaciador C3 en 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58)

- 5 Para maximizar la resistencia a nucleasas son deseables aptámeros con múltiples sustituciones de 2'-O-metilo. La adición del espaciador C3 o fracciones Heg en combinación con sustituciones múltiples de 2'-O-metilo puede aumentar potencialmente aún más la estabilidad de nucleasa. Sobre la base de la información de unión del recorrido 2'-OMe anterior, se creó una serie de aptámeros con diversas adiciones de 2'-OMe en las que se incorporaron adiciones dentro de cada aptámero con y sin sustitución simultánea de espaciadores C3 o fracciones Heg por
- 10 nucleótidos de citosina identificados previamente para permitir dicha sustitución (Números de identificación de secuencia 116 a 130). Por otra parte, se exploraron las sustituciones de base en ciertas posiciones en combinación con varias sustituciones 2'-OMe con y sin la sustitución simultánea de un espaciador C3 (Números de secuencia ID 138 a 151). En la Tabla 8 se muestran secuencias construidas y la afinidad de unión asociada. En esta tabla el superíndice 1 ⁽¹⁾ representa un nucleótido con una sustitución 2'-O-metil, "P" representa NapdU, "C3" representa un espaciador de 3 carbonos, "Heg" representa un hexaetilén glicol, "A", "C", "T", "U" y "G" representan las nucleobases de origen natural y "NB" representa la falta de unión de hasta 100 nM proteína C3 humana. No todas las combinaciones mantuvieron una unión de alta afinidad. Por ejemplo 8491-94_91 (SEQ ID NO: 119) 8491-94_92
- 15

(SEQ ID NO: 120) y 8491-94_126 (SEQ ID NO: 138) no presentaron una actividad de unión discernible. Sin embargo, otras combinaciones incluyendo 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125), que contiene 17 nucleótidos 2'-O-metilo, siguen manteniendo una unión de alta afinidad a proteína C3 humana. Se examinaron las secuencias relativas en cuanto a su capacidad para inhibir la proteína C3 en el ensayo de hemólisis (Figura 5b). Los aptámeros 8491-94_90 (SEQ ID NO: 118), 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125) y 8491-94_100 (SEQ ID NO: 128) inhiben con valores IC₅₀ de 18,9 nM, 15,6 nM y 19,7 nM, respectivamente. Por otra parte, se demuestra que el aptámero 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125) inhiben la liberación de C3a en suero humano normal al 34 % con un valor IC₅₀ de 3 mM (Figura 6).

Tabla 8. Sustituciones múltiples de 2'-O-metilo o sustituciones múltiples de 2'-O-metilo con y sin sustituciones de espaciador C3 y/o nucleótido en aptámero de 28-meros 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58). Todas las secuencias contienen un desoxitimidina unida 3'-3' en el término 3' (no se muestra)

Aptámero ID. No.	Secuencia (5'→3')	K _d (M)	SEQ ID NO.
8491-94_88	C ¹ -G-G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A-A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P-A-C- G-P-P-C-C-C-G ¹	2.48E-11	116
8491-94_89	C ¹ -G-G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P-A-C- G-P-P-C-C-C-G ¹	1.73E-11	117
8491-94_90	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P-A- C-G-P-P-C-C-C ¹ -G ¹	4.24E-12	118
8491-94_91	C ¹ -G-G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A- C-G-P ¹ -P ¹ -C-C-C-G ¹	NB	119
8491-94_92	C ¹ -G-G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A- C-G-P ¹ -P ¹ -C ¹ -C-C-G ¹	NB	120
8491-94_93	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A- C-G-P ¹ -P ¹ -C-C ¹ -C ¹ -G ¹	1.52e-11	121
8491-94_94	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A- C-G-P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	5.57e-11	122
8491-94_95	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ - C-G-P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	3.57e-11	123
8491-94_96	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ - A ¹ -C-G-P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	3.64e-11	124
8491-94_97	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ - A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	5.49e-11	125
8491-94_98	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ - A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	9.50e-11	126
8491-94_99	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ - A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C3-C ¹ -C ¹ -G ¹	1.67e-10	127
8491-94_100	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C3-P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ - A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C3-C ¹ -C ¹ -G ¹	7.94e-11	128
8491-94_101	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P-A ¹ - C-G ¹ -P-P-C ¹ -C ¹ -G ¹	2.19e-10	129
8491-94_102	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C3-P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P-A- C-G-P-P-C3-C ¹ -C ¹ -G ¹	6.03e-11	130
8491-94_126	C ¹ -A-G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ A-P-A ¹ -G-P-C-C-A-P ¹ -A ¹ - C-A-P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -A	NB	138
8491-94_127	G ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ - C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹	4.5e-11	139
8491-94_128	T-G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ - C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	3.8e-11	140

8491-94_129	T-G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ - C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	1.79e-11	141
8491-94_130	T-G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ - T-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	1.79e-08	142
8491-94_131	T-G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ - T-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	5.64e-09	143
8491-94_132	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ - T-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	1.27e-08	144
8491-94_133	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ - A ¹ -T-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	5.06e-09	145
8491-94_134	G ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ - A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹	1.07e-10	146
8491-94_135	G ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ - C-A ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹	1.53e-08	147
8491-94_136	G ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ - A ¹ -C-A ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹	9.10e-09	148
8491-94_137	U ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ - A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	1.19e-10	149
8491-94_138	U ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ - A ¹ -C-A ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	1.82e-08	150
8491-94_139	U ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ - C-A ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	2.67e-08	151

Nucleótido que contiene azúcar 2'-OMe

Ejemplo 5: Determinación de sensibilidad de aptámero a la digestión a través de ADNasa I o ADNasa II

5 Este ejemplo proporciona un resumen de los métodos y materiales generales utilizados en el presente documento para determinar la sensibilidad de un aptámero a la digestión a través de desoxirribonucleasa I (DNasa I) o desoxirribonucleasa II (ADNasa II). Para el ensayo de estabilidad de aptámero a ADNasa I el aptámero se incubaron aptámeros purificados con poliacrilamida-gel a una concentración final de 250 nM con 2 unidades/ml de ADNasa humana I (CELL SCIENCES, Cat No. CSI10719) en tampón de nucleasa (10 mM Tris HCl pH 7,6, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂) a 37 °C en un volumen de reacción total de 100 µl. En varios momentos, se recogió una parte alícuota de 15 µl y se detuvo la reacción añadiendo un volumen equivalente de 2 x tampón de carga de gel (93,85% formamida, 0,2% SDS, 20 mM Na₂EDTA, 0,05% xileno cilanol y 0,1% Naranja G) y calentando a 95 °C durante 2 minutos. Se separaron los productos de digestión del aptámero de longitud completa por electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando gel desnaturante de poliacrilamida al 15 % (urea 8 M). Se llevó a cabo la electroforesis a 200 V durante 20 minutos en un sistema de tampón Tris. Se tiñeron los geles con aproximadamente 2 µM de oro de SYBR® (MOLECULAR PROBES, Cat No. S11494) durante 10 minutos para visualizar las bandas. Se cuantificó la cantidad de aptámero de longitud completa que quedó en cada punto temporal utilizando el software de análisis FlourChem®Q (ALFA INNOTECH). Cuando fue necesario, se determinó la intensidad de cada marca seguido de una sustracción del fondo y los datos presentados como porcentaje restante de ADN de entrada de longitud completa en el punto temporal cero. Se utilizaron versiones que contenía 5'-hidroxilo de aptámeros con dT unida 3'-3' dT "selladas" para estos experimentos.

25 Para el ensayo de estabilidad de aptámero de ADNasa II, se incubaron aptámeros purificados con gel de poliacrilamida a una concentración final de 250 nM con 140 unidades/ml de ADNasa II porcina (WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION) en tampón de nucleasa (0,1M NaOAc pH 4.6, 2.0 mM MgCl₂, 15 mM NaCl₂) a 37 °C en un volumen de reacción total de 100 µl. En varios momentos, se recogió una parte alícuota de 15 µl y se detuvo la reacción añadiendo un volumen equivalente de 2x tampón de carga de gel (93,85% formamida, 0,2% SDS, 20 mM Na₂EDTA, 0,05% xileno cilanol y 0,1 % Naranja G) y calentando a 95 °C durante 2 minutos. Se separaron los productos de reacción del aptámero de longitud completa por electroforesis con gel de poliacrilamida utilizando un gel desnaturante de poliacrilamida al 15 % (urea 8 M) y electroforesis realizada a 200 V durante 20 minutos en un sistema de tampón Tris borato EDTA. Se tiñeron los geles con aproximadamente 2 µM de oro SYBR® (MOLECULAR PROBES, Cat No. S1 1494) durante 10 minutos para visualizar las bandas. Se cuantificó la cantidad del aptámero de longitud completa restante en cada punto temporal utilizando un software de análisis FlourChem® Q (ALFA INNOTECH). Cuando fue necesario, se determinó la intensidad de cada banda seguido de una sustracción del fondo y los datos presentados como porcentaje restante de ADN de entrada de longitud completa en el punto

temporal cero. Se utilizaron versiones que contenían 5'-hidroxilo de aptámeros con dT unido 3'-3' "sellado" para estos experimentos.

5 Se utilizaron estos ensayos para determinar si los aptámeros con múltiples sustituciones 2'-O-metilo presentaban una potenciación de la resistencia a la nucleasa en comparación con los aptámeros 28-mers 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58) que no contiene sustituciones 2'-O-metilo. El uso de nucleótidos NapdU, las sustituciones 2'-OMe y la adición de desoxitimidina invertida en el término 3' en 8491-94_53 juntos pueden impartir un sustancial grado de protección de nucleasa en comparación con ADN sin modificar. No obstante 8491-94_53 todavía no es totalmente estable en presencia de nucleasas. Por ejemplo, 8491-94_53 (SEQ ID NO: 58) puede ser digerido por ADNasa recombinante humana I (Figura 7) y ADNasa II pancreática porcina (Figura 8). Tal como se muestra en la Figura 7, una disminución de la intensidad del aptámero 8491-94_53 de longitud completa (banda superior) en aproximadamente un 20 % a lo largo de 2 horas y una disminución de la intensidad en aproximadamente un 75 % a lo largo de 12 horas en la Figura 8 indica sensibilidad a la digestión a través de ADNasa I y ADNasa II, respectivamente. Se analizaron también cuatro aptámeros de múltiples sustituciones 2'-OMe en cuanto a la resistencia a la nucleasa. Fueron 8491-94_90 (10 sustituciones 2'-OMe), 8491-94_97 (17 sustituciones 2'-OMe), 8491-94_100 (15 sustituciones 2'-OMe y 3 sustitución espaciador C3s) y 8491-94_102 (9 sustituciones 2'-OMe y 3 sustituciones espaciador C3s). Los aptámeros 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125) y 8491-94_102 (SEQ ID NO: 130) presentaron una potenciación de la estabilidad a ADNasa I mientras que los aptámeros 8491-94_90 (SEQ ID NO: 118) y 8491-94_100 (SEQ ID NO: 128) no (Figura 7). Los aptámeros 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125) y 8491-94_100 (SEQ ID NO: 128) presentaron una potenciación de la estabilidad frente a la ADNasa II mientras que los aptámeros 8491-94_90 (SEQ ID NO: 118) y 8491-94_102 (SEQ ID NO: 130) no (Figura 8). Por lo tanto, el aptámero 8491-94_97 (SEQ ID NO: 125) fue uno de los cuatro aptámeros analizados con múltiples sustituciones estabilizantes de nucleasa que presentaron una potenciación de la estabilidad tanto frente a ADNasa I como ADNasa II

25

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero que se une a una proteína C3, en donde el aptámero comprende la secuencia 5'-KPGRMPDVD_nLPAWPSVGPAYRPP -3' (SEQ ID NO: 152)
 5 en la que,
 K es una pirimidina modificada en C-5, C, U, T, G o un espaciador de 3 carbonos;
 cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5;
 cada R es independientemente, y cada vez que aparece, A o G;
 10 M es C, U, T, una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos;
 cada D es independientemente, y cada vez que aparece, A, C o un espaciador de 3 carbonos;
 cada V es independientemente, y cada vez que aparece, A, G, C o un espaciador de 3 carbonos;
 L es A, U, T o una pirimidina modificada en C-5;
 W es G o un espaciador de 3 carbonos;
 15 S es C o un espaciador de 3 carbonos;
 Y es C, U o T; y
 n es 0 o 1.
2. El aptámero de la reivindicación 1, en donde el aptámero comprende las secuencias:
 20 5'- KPGRMPDVD_nLPAWPSVGPACGPP -3' (SEQ ID NO: 131),
 5'- KPGRMPDVD_nLPAWPSVGPACGPPM -3' (SEQ ID NO: 135) o
 5'- KPGRMPDVD_nLPAWPSVGPAYRPPM -3' (SEQ ID NO: 153).
3. Un aptámero que se une a una proteína C3, en donde el aptámero comprende la secuencia 5'-KPGRMPXPAWPSVGPAYRPP -3' (SEQ ID NO: 154)
 25 en la que,
 K es una pirimidina modificada en C-5, C, U, T, G o un espaciador de 3 carbonos;
 30 cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5;
 R es A o G;
 M es C, U, T una pirimidina modificada en C-5 o un espaciador de 3 carbonos;
 V es A, G, C o un espaciador de 3 carbonos;
 W es G o un espaciador de 3 carbonos;
 35 S es C o un espaciador de 3 carbonos;
 Y es C, U o T; y
 X es un engarce seleccionado entre un engarce de C₂-C₂₀ sustituido o sin sustituir, un alquilen glicol y un polialquilen glicol.
4. El aptámero de la reivindicación 3, en donde el aptámero comprende las secuencias
 40 5'- KPGRMPXPAWPSVGPACGPP -3' (SEQ ID NO: 136),
 5'- KPGRMPXPAWPSVGPACGPPM -3' (SEQ ID NO: 137) o
 5'- KPGRMPXPAWPSVGPAYRPPM -3' (SEQ ID NO: 155).
5. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que
 45 K es una pirimidina modificada en C-5, C o G;
 cada M es independientemente, y cada vez que aparece, C o una pirimidina modificada en C-5; y/o
 50 L es A o pirimidina modificada en C-5.
6. Un aptámero que se une a una proteína C3, en donde el aptámero comprende la secuencia
 55 5'- PAWPSVGPAYRPP -3' (SEQ ID NO: 156), o
 5'- PAWPSVGPACGPP -3' (SEQ ID NO: 134),
 en las que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; W es G o un espaciador de 3 carbonos; S es C o un espaciador de 3 carbonos; V es A, G o C; Y es C, U o T; y R es G o A.
7. Un aptámero que se une a una proteína C3, en donde el aptámero comprende una secuencia que es al menos un
 60 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 99 % o un 100 %
 idéntico a una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 4 a 28, 32 a 34, 37 a 75, 78 a 118, 121 a 130 y 139 a
 151, en las que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5.
8. Un aptámero que se une a una proteína C3, en donde el aptámero comprende una primera región y una segunda
 65 región, en donde la primera región comprende la secuencia 5'- PAGPC-3' (SEQ ID NO: 132) y la segunda región
 comprende las secuencias 5'- GPAYRPP-3' (SEQ ID NO: 156) o 5'- GPACGPP-3' (SEQ ID NO: 133), en las que

cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; Y es C, U o T; y R es G o A.

5 9. El aptámero de la reivindicación 8, en el que el extremo 3' de la primera región está covalentemente unido al extremo 5' de la segunda región.

10 10. El aptámero de la reivindicación 9, en el que la primera región y la segunda región están unidas covalentemente mediante al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco engarces, en donde cada engarce es independientemente seleccionado entre un nucleótido, un engarce de C₂-C₂₀ sustituido o sin sustituir, un alquilen glicol y un polialquilen glicol.

11. El aptámero de la reivindicación 10, en el que cada engarce se selecciona independientemente entre un nucleótido, un espaciador de 3 carbonos y un hexaetilen glicol.

15 12. Un aptámero que se une a C3, en donde el aptámero comprende la secuencia 5'-PAGPC -3' (SEQ ID NO: 132), en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5.

20 13. Un aptámero que se une a C3, en donde el aptámero comprende las secuencias 5'-GPAYRPP -3' (SEQ ID NO: 156) o GPACGPP -3' (SEQ ID NO: 133), en las que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5; Y es C, U o T; y R es G o A.

14. Un aptámero que se une a una proteína C3, en donde el aptámero comprende la secuencia SEQ ID NO: 125, en la que cada P es independientemente, y cada vez que aparece, una pirimidina modificada en C-5.

25 15. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aptámero comprende al menos un nucleótido modificado con 2'-O-metilo.

30 16. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aptámero tiene de 24 a 100 nucleótidos de longitud o de 30 a 60 nucleótidos de longitud o de 28 a 60 nucleótidos de longitud o de 28 a 50 nucleótidos de longitud o de 28 a 40 nucleótidos de longitud o de 40 a 50 nucleótidos de longitud o de 28 a 32 nucleótidos de longitud.

35 17. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aptámero inhibe la escisión de la proteína C3.

18. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada pirimidina modificada en C-5 se selecciona independientemente entre:

40 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BndU), 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-fenetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (PEdU), 5-(N-tiofenilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ThdU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (iBudU), 5-(N-tirosilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TyrdU), 5-(N-3,4-metilendioxi-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (MBndU), 5-(N-4-fluorobencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (FBndU), 5-(N-3-fenilpropilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (PPdU), 5-(N-imidizoliletilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ImdU), 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-desoxiuridina (TrpdU), 5-(N-treoninilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (ThrdU), 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-triptaminocarboxiamida)-2'-fluorouridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio) propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NapdU), 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NapdU), 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftilmetilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-1-naftiletilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (NEdU), 5-(N-1-naftiletilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-1-naftiletilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-2-naftiletilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (2NEdU), 5-(N-2-naftiletilcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-2-naftiletilcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BFdU), 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina, 5-(N-3-benzofuraniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina, 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-desoxiuridina (BTdU), 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-O-metiluridina y 5-(N-3-benzotiofeniletalcarboxiamida)-2'-fluorouridina.

60 19. El aptámero de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína C3 es proteína C3 humana.

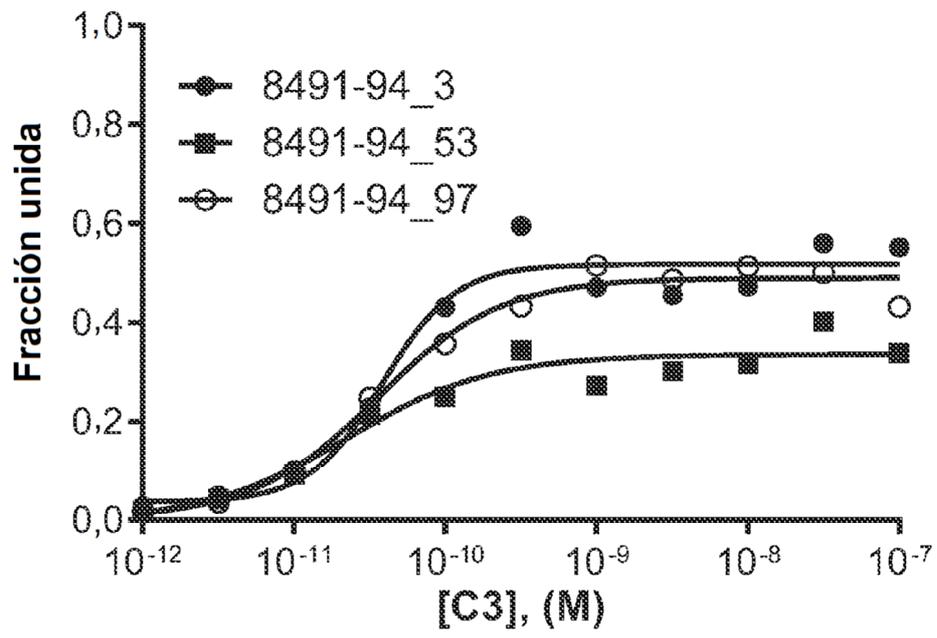


Figura 2

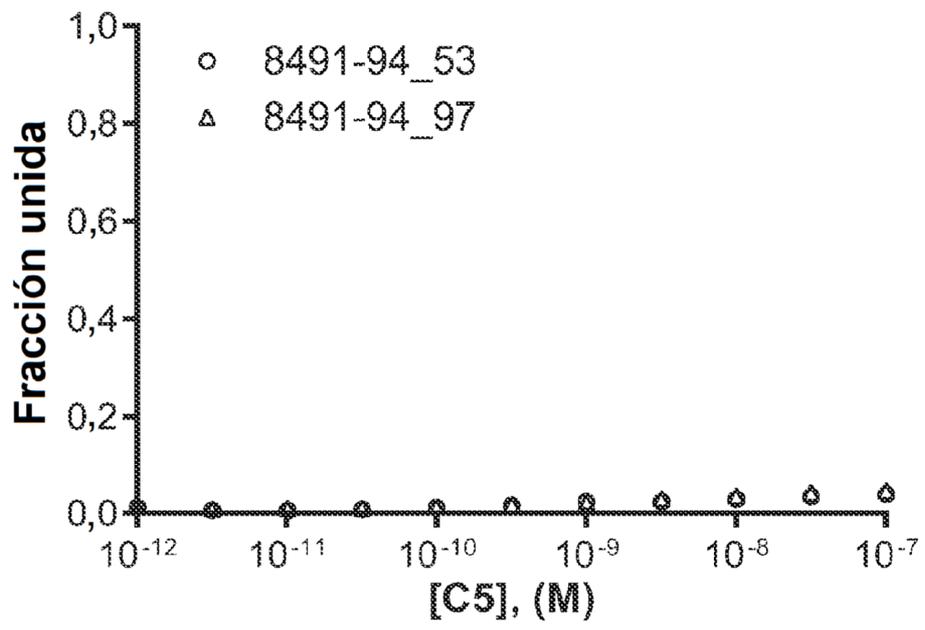


Figura 3

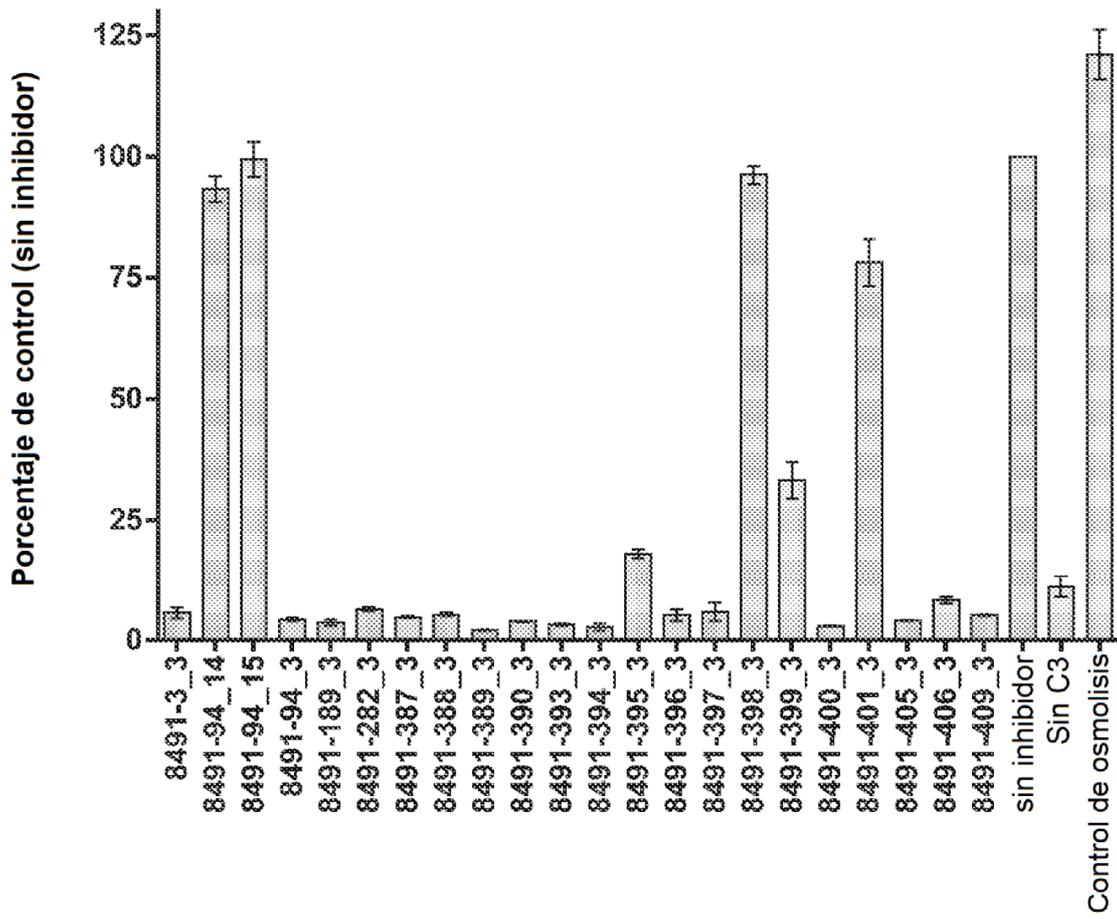
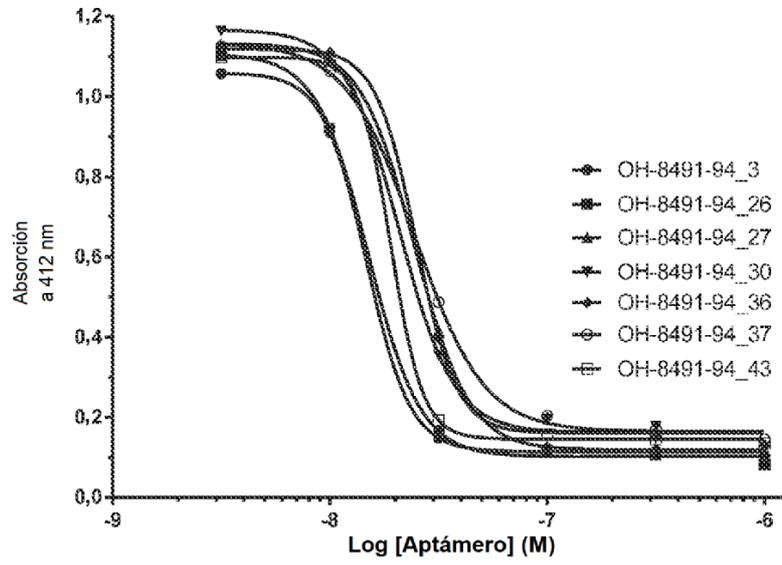


Figura 4

(A)



(B)

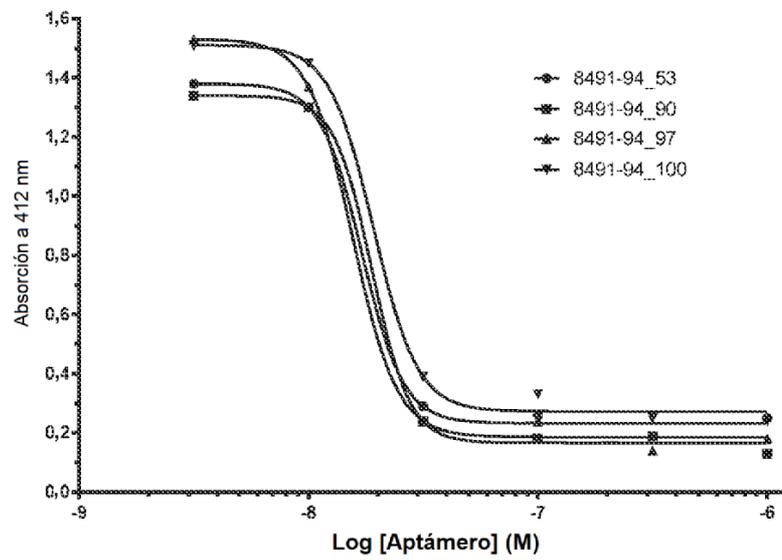


Figura 5

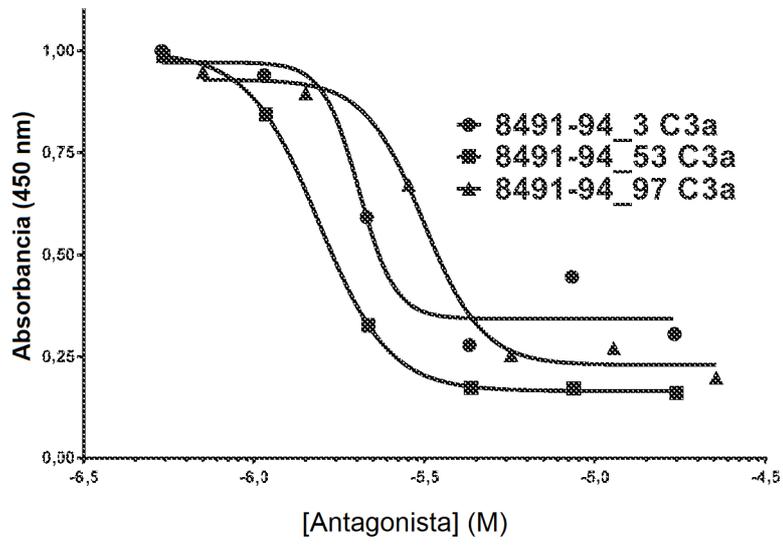
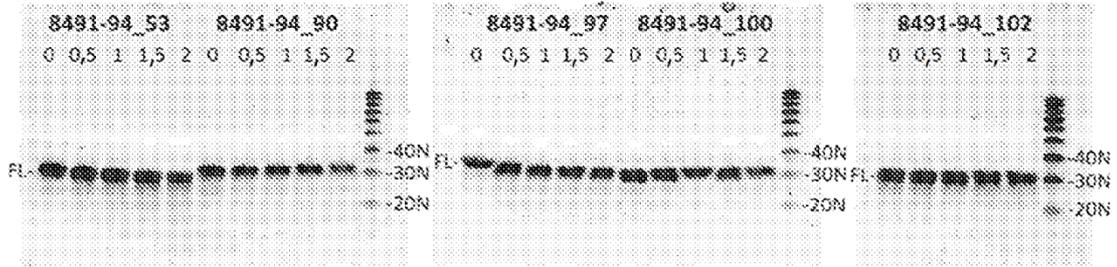


Figura 6

(A)



(B)

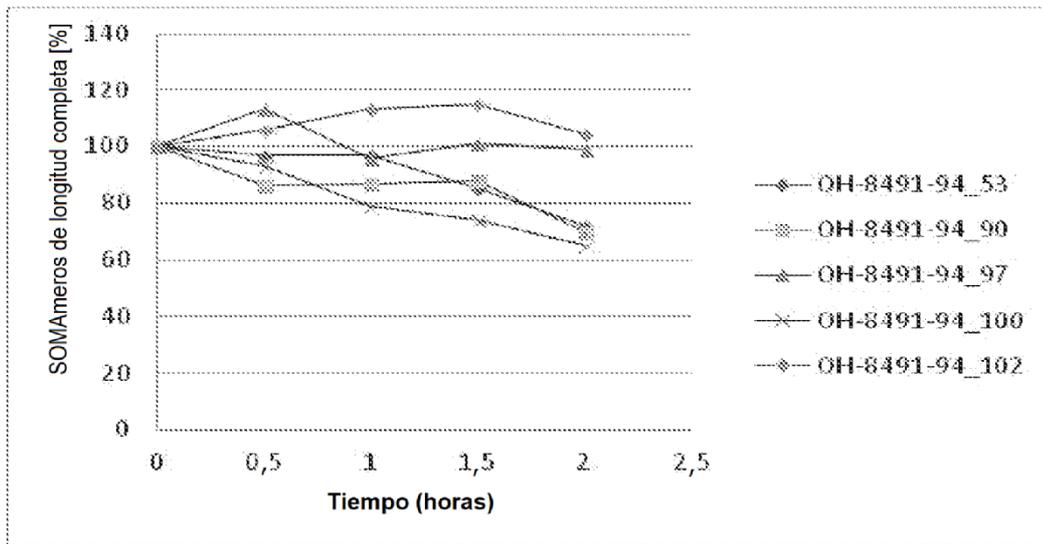
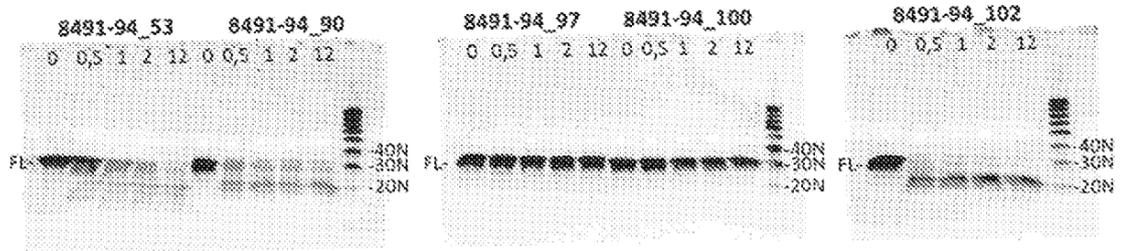


Figura 7

(A)



(B)

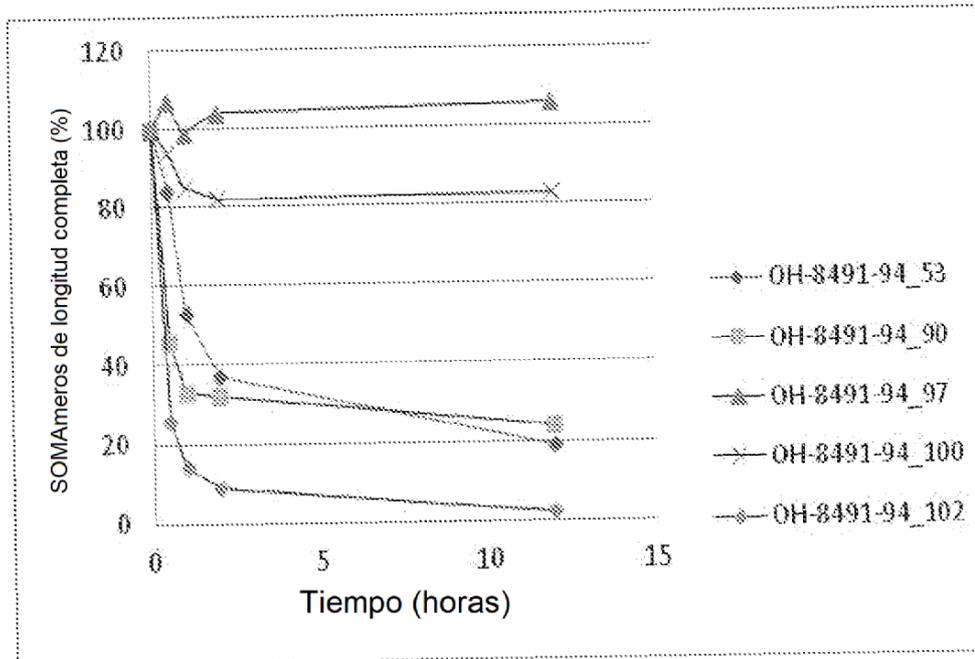


Figura 8

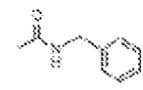
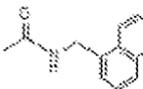
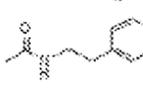
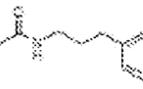
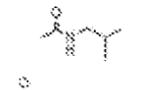
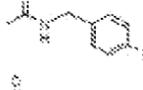
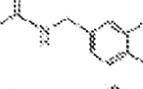
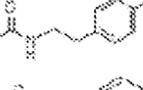
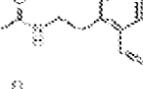
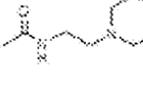
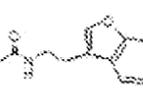
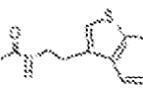
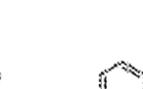
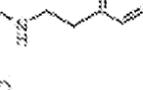
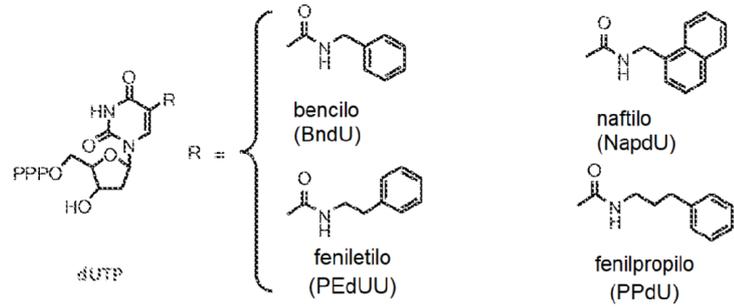
Abreviatura	Modificacion 5dU	Estructura química
Bn	bencilmetilo	
Nap	1-naftilmetilo	
PE	2-feniletilo	
PP	3-fenilpropilo	
Ib	iso-butilo	
FBn	4-fluorobencilmetilo	
2Nap	2-naftilmetilo	
Tyr	tirosilo	
NE	1-naftiletilo	
MBn	3,4-metilendioxi bencilo	
MOE	morfolinoetilo	
BF	3-benzofuraniletilo	
BT	3-benzotiofeniletilo	
2NE	2-naftil-2-etilo	
Trp	3-indol-2-etilo	

Figura 9

Sustituciones de base modificada



Sustituciones de cadena principal y abásicas

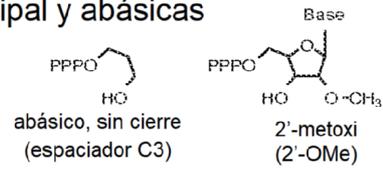


Figura 10

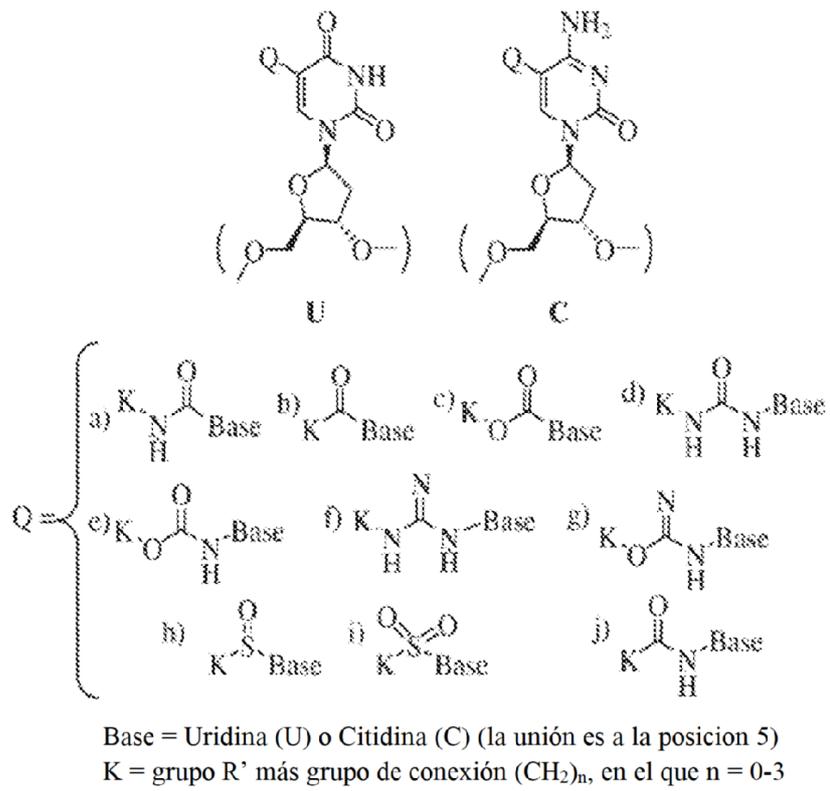


Figura 11

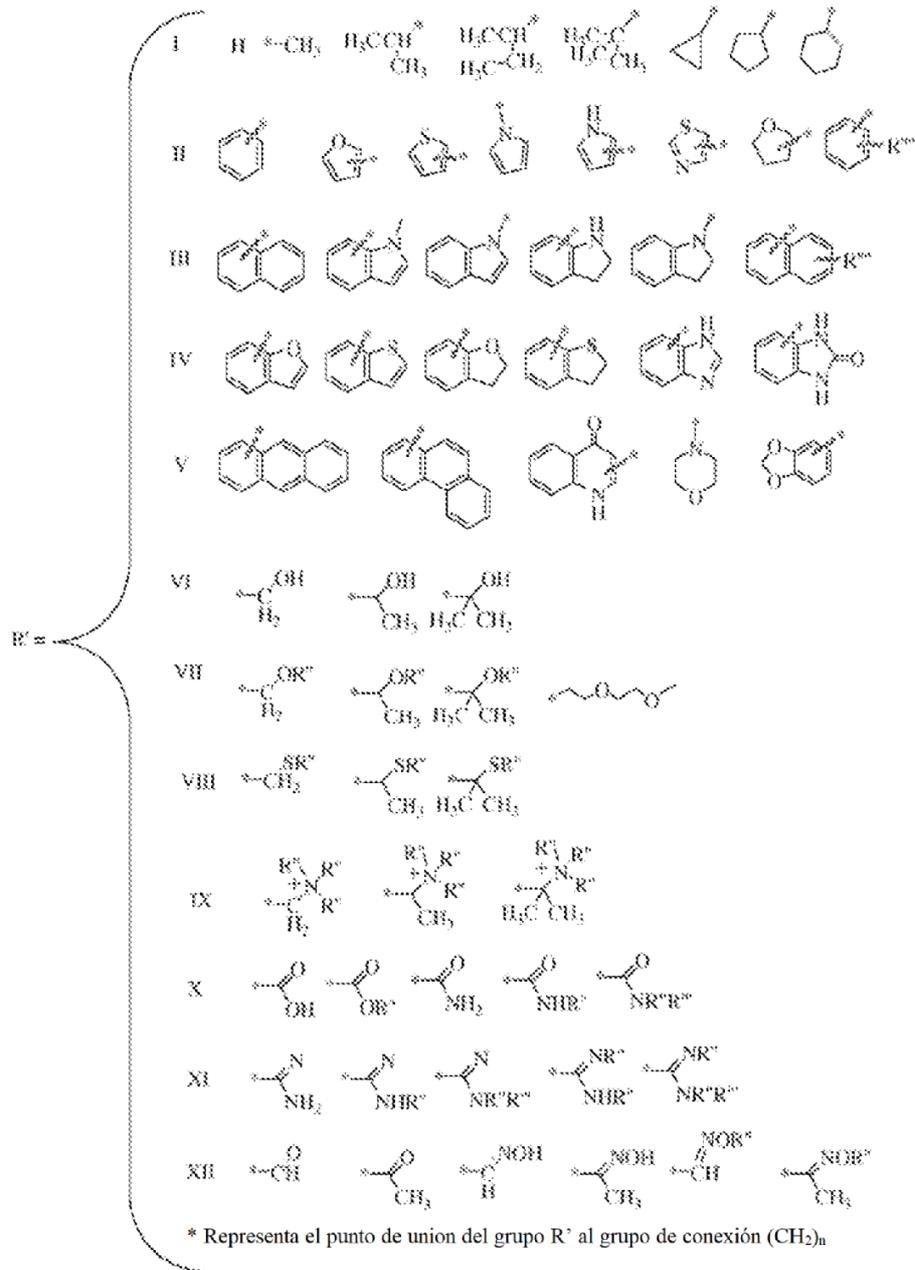


Figura 11 (cont.)

en el que

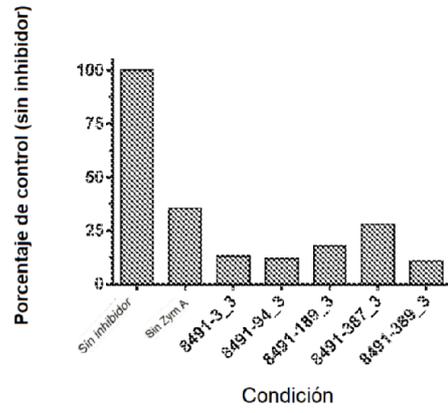
R^{'''} se selecciona del grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C20) lineal o ramificado; halógeno (F, Cl, Br, I); nitrilo (CN); ácido borónico (BO₂H₂); ácido carboxílico (COOH); éster de ácido carboxílico (COOR^{''}); amida primaria (CONH₂); amida secundaria (CONHR^{''}), amida terciaria (CONR^{''}R^{''}); sulfonamida (SO₂NH₂); N-alquilsulfonamida (SONHR^{''}).

en el que

R^{''}, R^{'''} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un alquilo inferior (C1-C2) lineal o ramificado; fenilo (C₆H₅); un anillo fenilo sustituido con R^{''''} (R^{''''}(C₆H₄); en el que R^{''''} es como se ha definido anteriormente; un ácido carboxílico (COOH); un éster de ácido carboxílico (COOR^{''''}); en el que R^{''''} es un alquilo inferior (C1-C20) lineal o ramificado; y cicloalquilo; en el que R^{''} = R^{'''} = (CH₂)_n, en el que n es = 2-10.

Figura 11 (cont.)

A



B

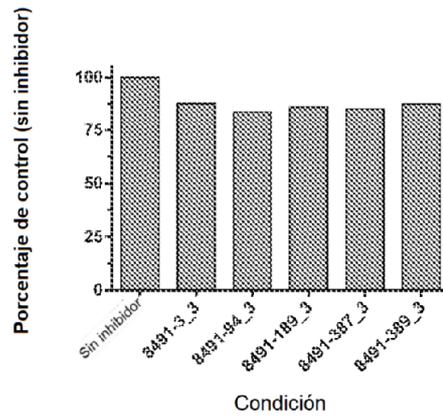


Figura 12