

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 333**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01) **A61P 31/16** (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2013 PCT/CA2013/050378**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13170385**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2013 E 13791584 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2849760**

54 Título: **Métodos de complejos de quelatos de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

18.05.2012 US 201261648694 P

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

17.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BAZINET, MICHEL y
VAILLANT, ANDREW**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 767 333 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

Métodos de complejos de quelatos de oligonucleótidos

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a métodos para el tratamiento de enfermedades que implican la administración o el uso de un complejo de quelato de oligonucleótido (ON). Estas enfermedades pueden incluir, una infección viral, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad por priones o distrofia muscular de Duchene.

Antecedentes de la invención

- 10 Los complejos de quelatos de ON son dos o más ON unidos intermolecularmente por un catión metálico divalente o multivalente. Los complejos de quelatos de ON neutralizan las propiedades de quelación inherentes de los ON que pueden contribuir a los efectos secundarios relacionados con la administración con estos compuestos. La administración de complejos de quelatos de ON es un método novedoso de administrar un ON a un sujeto donde se mitigan los efectos secundarios relacionados con la administración asociados con los ON no quelatados (que son ON administrados como sales de sodio como se utiliza comúnmente en la técnica). Estos efectos secundarios pueden
- 15 incluir temblores, fiebre y escalofríos con infusión o inyección intravenosa, inflamación y dolor en el sitio de inyección con administración subcutánea. Además, preparando los ON como complejos quelados, se puede mejorar su comportamiento farmacocinético, proporcionando un rendimiento terapéutico aumentado con una dosificación similar en comparación con los ON no quelados como se describe en la publicación de solicitud internacional nº WO 2012/021985 y la publicación de solicitud de EE.UU. nº 2012/0046348.
- 20 Por lo tanto, es deseable proporcionar un complejo de quelato de ON que actúe por un mecanismo dependiente de secuencia o independiente de secuencia que tendrá un efecto terapéutico contra muchos estados de enfermedad, que incluye infecciones virales, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, enfermedad de Alzheimer o enfermedad por priones y que da como resultado la reducción o eliminación de los efectos secundarios relacionados con la administración comunes a los ON.
- 25 Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de proporcionar un método para el tratamiento de los estados de enfermedad mencionados anteriormente que comprende la administración a un sujeto en necesidad de tratamiento una composición farmacéutica que comprende un complejo de quelato de ON.

Compendio

- 30 La presente descripción se refiere a un método para tratar cualquier estado de enfermedad que pueda verse afectado por el tratamiento con un oligonucleótido mediante la administración del oligonucleótido como un complejo de quelato.
- La presente descripción se refiere a un oligonucleótido formulado como un complejo de quelato para uso en el tratamiento de cualquier estado de enfermedad que pueda verse afectado por el tratamiento con el oligonucleótido.
- La presente descripción se refiere al uso de un oligonucleótido formulado como un complejo de quelato en la fabricación de un medicamento para tratar cualquier estado de enfermedad que pueda verse afectado por el
- 35 tratamiento con el oligonucleótido.
- La presente invención se refiere a un método para tratar una infección viral que comprende la etapa de administrar un complejo de quelato de ON antiviral a un sujeto en necesidad de tratamiento.
- Se proporciona el uso de un complejo de quelato de ON antiviral para utilizar en el tratamiento de una infección viral. En particular, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un complejo de quelato
- 40 de oligonucleótido antiviral preparado con un catión metálico divalente para uso en un método para tratar una infección viral.
- La presente invención proporciona el uso de un complejo de quelato de ON antiviral en la fabricación de un medicamento para tratar una infección viral.
- En una realización, el complejo de quelato de oligonucleótido antiviral comprende al menos un oligonucleótido
- 45 seleccionado de las SEQ ID NOs: 1-6 o 10-18.
- Esta descripción proporciona un método para tratar la hipercolesterolemia que comprende la etapa de administrar un complejo de quelato de ON anti-colesterol a un sujeto en necesidad de tratamiento.
- El complejo de quelato de oligonucleótido anti-colesterol puede comprender al menos un oligonucleótido seleccionado de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 12, 15, 16 o 17.
- 50 Esta descripción proporciona un método para tratar la hipertrigliceridemia que comprende la etapa de administrar un complejo de quelato de ON anti-triglicérido a un sujeto en necesidad de tratamiento.

El complejo de quelato de oligonucleótido anti-colesterol puede comprender al menos un oligonucleótido seleccionado de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 12, 15, 16 o 17.

Esta descripción proporciona un método para tratar la enfermedad de Alzheimer que comprende la etapa de administrar un complejo de quelato de ON anti-Alzheimer a un sujeto en necesidad de tratamiento.

- 5 Esta descripción proporciona un método para tratar la enfermedad por priones que comprende la etapa de administrar un complejo de quelato de ON anti-priones a un sujeto en necesidad de tratamiento.

Esta descripción proporciona un método para tratar las enfermedades que surgen de un empalme incorrecto durante la maduración del ARNm, que incluye la distrofia muscular de Duchene (DMD), que comprende la etapa de administrar un complejo de quelato de ON diseñado para corregir el empalme incorrecto en la DMD.

- 10 La presente invención proporciona un complejo de quelato de ON antiviral para uso en el tratamiento de una infección viral.

Se proporciona el uso de un complejo de quelato de ON antiviral en la fabricación de un medicamento para tratar un viral. En una realización, el complejo de quelato de oligonucleótido antiviral comprende al menos un oligonucleótido seleccionado de las SEQ ID NOs: 1-6 o 10-18.

- 15 Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de ON anti-colesterol para tratar la hipercolesterolemia.

Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de ON anti-colesterol en la fabricación de un medicamento para tratar la hipercolesterolemia.

El complejo de quelato de oligonucleótido anti-colesterol puede comprender al menos un oligonucleótido seleccionado de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 12, 15, 16 o 17.

- 20 Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de ON anti-triglicérido para tratar la hipertrigliceridemia.

Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de ON anti-triglicérido en la fabricación de un medicamento para tratar la hipertrigliceridemia.

El complejo de quelato de oligonucleótido anti-triglicéridos comprende al menos un oligonucleótido seleccionado de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 12, 15, 16 o 17.

- 25 Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de ON anti-Alzheimer para tratar la enfermedad de Alzheimer.

Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de ON anti-Alzheimer en la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Alzheimer.

Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de ON anti-priones para tratar la enfermedad por priones.

- 30 Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de ON anti-priones en la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad por priones.

Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de ON diseñado para corregir el empalme incorrecto en la DMD para tratar las enfermedades que surgen del empalme incorrecto durante la maduración de ARNm, que incluyen la distrofia muscular de Duchene (DMD).

- 35 Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de ON diseñado para corregir el empalme incorrecto en la DMD en la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades que surgen de un empalme incorrecto durante la maduración de ARNm, que incluyen la distrofia muscular de Duchene (DMD).

Esta descripción se refiere a un método para el tratamiento de la hipercolesterolemia, el método comprende la administración de un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 20.

- 40 Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 20 para el tratamiento de la hipercolesterolemia.

Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 20 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hipercolesterolemia.

- 45 Esta descripción se refiere a un método para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchene, el método comprende la administración de un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 19.

Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 19 para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchene.

Esta descripción se refiere al uso de un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 19 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchene.

Se proporciona un método para el tratamiento de la infección por hepatitis C, el método comprende la administración de un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 7.

- 5 Se proporciona el uso de un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 7 para el tratamiento de la infección por hepatitis C.

Se proporciona el uso de un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende la SEQ ID NO: 7 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infección por hepatitis C.

- 10 La presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un complejo de quelato de oligonucleótido antiviral para el tratamiento de una infección viral.

Esta descripción se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un complejo de quelato de oligonucleótido anti-colesterol para el tratamiento de la hipercolesterolemia.

Esta descripción se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un complejo de quelato de oligonucleótido anti-triglicérido para el tratamiento de hipertrigliceridemia.

- 15 Esta descripción se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un complejo de quelato de oligonucleótido anti-Alzheimer para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Esta descripción se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un complejo de quelato de oligonucleótido anti-priones para el tratamiento de la enfermedad por priones.

- 20 Esta descripción se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un complejo quelato que comprende la SEQ ID NO: 20 para el tratamiento de la hipercolesterolemia.

Esta descripción se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un complejo de quelato que comprende la SEQ ID NO: 19 para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchene.

Se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un complejo de quelato que comprende la SEQ ID NO: 7 para el tratamiento de la infección por hepatitis C.

- 25 En una realización, el complejo de quelato de oligonucleótido se prepara con un catión metálico divalente.

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido se prepara con calcio.

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido se prepara con magnesio.

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido se prepara con hierro (2+), manganeso, cobre y/o zinc.

- 30 En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido comprende dos o más cationes metálicos divalentes diferentes.

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido comprende calcio y magnesio.

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

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

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos un oligonucleótido totalmente fosforotioado.

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos un oligonucleótido con una ribosa 2' modificada.

- 40 En otra realización adicional, el complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos un oligonucleótido que tiene cada ribosa 2' O-metilada.

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos un oligonucleótido que tiene al menos una 5' metilcitosina.

- 45 En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos un oligonucleótido en donde cada citosina es 5' metilcitosina.

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido contiene al menos un oligonucleótido que está completamente fosforotioado y tiene todas las ribosas con la modificación 2' O metil y tiene todas las citosinas presentes como 5' metilcitosina.

5 En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos un oligonucleótido seleccionado de las SEQ ID NOs: 1-6 o 10-18.

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido está formulado para una administración subcutánea.

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido está formulado para infusión intravenosa.

10 En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido está formulado para una administración seleccionada del grupo que consiste en: intraocular, ingestión oral, inhalación entérica, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección intratecal, infusión intratecal, intratraqueal, inyección intravenosa y localmente.

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido se formula para una administración mediante aerosol.

En otra realización, el virus que causa la infección es el virus de la hepatitis B.

En otra realización, el virus que causa la infección es un hepadnavirus.

En una realización adicional, el virus que causa la infección es el virus de la hepatitis delta.

15 En otra realización, el virus que causa la infección es influenza.

20 En otra realización, el virus que causa la infección se selecciona del grupo que consiste en: un miembro de los retroviridae, HIV-1, HIV-2, un miembro de los herpesviridae, HSV-1, HSV-2, citomegalovirus, un miembro de los poxviridae, un miembro de los paramyxoviridae, virus sincitial respiratorio, virus parainfluenza, un miembro de los bunyaviridae, hantavirus, un miembro de los filoviridae, virus del Ébola, virus de Marburg, un miembro de los flaviviridae, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, virus de la hepatitis C, un miembro de los orthomyxoviridae, un miembro de los togaviridae, un miembro de los coronavirus, un miembro de los rhabdoviridae y un miembro de los arenaviridae.

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido comprende la SEQ ID NO: 2 (REP 2055).

En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido comprende la SEQ ID NO: 18 (REP 2139).

25 En otra realización, el complejo de quelato de oligonucleótido comprende la SEQ ID NO: 11 (REP 2148).

Breve descripción de los dibujos

A continuación se hará referencia a los dibujos adjuntos:

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

35 La Fig. 2A ilustra las características químicas generales de los ON que no dependen de la secuencia ON. Independientemente de su secuencia, cualquier ON existe como un polímero que tiene actividades tanto hidrófobas como hidrófilas. La fosforotioación (representada en la estructura química en esta figura) sirve para aumentar la hidrofobicidad del polímero ON pero no afecta a la hidrofilia. La figura 2B conceptualiza la naturaleza de la quelación del ON de cationes metálicos divalentes y trivalentes. Los cationes metálicos (representados por círculos sólidos) unen intermolecularmente las superficies hidrófilas de los polímeros ON a través de puentes de iones metálicos (representados por elipses) entre dos o tres átomos sin puente de oxígeno o azufre en los enlaces fosfodiéster.

40 La Fig. 3 ilustra el modelo del comportamiento en disolución de los ON en presencia de cationes metálicos divalentes o multivalentes en diferentes ON y a concentraciones de los cationes metálicos divalentes. A) Bajas concentraciones de catión metálico divalente/trivalente, bajas concentraciones de ON producen dímeros o complejos de quelatos de ON de orden inferior. B) El aumento de las concentraciones de cationes metálicos divalente/trivalente producen más formación completa del complejo de quelato de ON en la disolución. C) Un mayor aumento en las concentraciones de ON en presencia de metales divalentes o trivalentes son capaces de producir complejos de quelatos de ON de orden superior con el aumento de las concentraciones de metales. Todos los complejos de quelatos en (A) a (C) son solubles en disolución acuosa por tener superficies hidrófilas todavía expuestas al ambiente acuoso manteniendo así la solubilidad. D) En concentración suficiente de ON y del metal, todas las superficies hidrófilas están ahora restringidas dentro de los complejos de quelatos de ON, dejando sólo las superficies hidrofóbicas expuestas al ambiente acuoso. Esto da como resultado la precipitación del complejo de quelato de ON.

La Fig. 4 ilustra el efecto del comportamiento de la disolución de complejos de quelatos fluorescentes-ON sobre la polarización de fluorescencia. Con el aumento de la concentración de metal, el tamaño (y masa) de la formación del complejo de quelato de ON también aumenta (véase la Fig. 3) y, por lo tanto, se mueve con mayor lentitud en la disolución. Este volteo más lento del complejo en la disolución conduce a un aumento de la polarización de fluorescencia y a un valor aumentado de mP.

Descripción detallada

Como se describe en la publicación de solicitud internacional nº WO 2012/021985 y la publicación de solicitud de EE.UU. nº 2012/0046348, los ON en disoluciones acuosas que contienen cualquier catión metálico simple que sea divalente (tal como por ejemplo, pero no limitado a, Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+}) no existen como sales sino como complejos quelados de ON. Estos complejos están compuestos por dímeros de ON u organizaciones moleculares de orden superior en las que los ON están unidos a sus cadenas principales de fosfodiéster a través de puentes de iones metálicos divalentes (véase la Fig. 2B). A concentraciones específicas de ON y cationes metálicos, estos complejos quelados son estables y solubles en disolución acuosa y secuestran eficazmente cualquier catión divalente en los complejos de quelatos de ON de la interacción de la disolución. También es probable que esta formación de complejo de quelato se produzca con cationes metálicos simples con una carga 3+ o mayor (como se representa en la Fig. 2B). Por lo tanto, los ON funcionan como quelantes de cationes metálicos multivalentes y no forman sales con cationes metálicos multivalentes.

Los complejos de quelatos de ON pueden contener diversos cationes metálicos multivalentes que incluyen calcio, magnesio, cobalto, hierro, manganeso, bario, níquel, cobre, zinc, cadmio, mercurio y plomo. Además, se demuestra que la quelación de estos cationes metálicos multivalentes da como resultado la formación de complejos de quelatos de ON compuestos por dos o más ON unidos a través de cationes metálicos y se producen con ON de más de 6 nucleótidos de longitud, y en presencia de ON con enlaces fosfodiéster o fosforotioato. Los ON pueden opcionalmente tener cada enlace fosforotioado. La quelación también se produce con los ON que contienen modificaciones 2' (tal como 2' O metil) en la ribosa o que contienen bases modificadas tal como 5' metilcitosina o 4-tiouracilo. Estas modificaciones 2' pueden estar presentes en una o más o todas las ribosas y las bases modificadas pueden estar presentes en una o más bases o estar universalmente presentes en cada base (es decir, todas las citosinas están presentes como 5' metilcitosina). Además, los complejos de quelatos de ON pueden comprender ON que contienen múltiples modificaciones tales como cada enlace fosforotioado, cada ribosa 2' modificada y cada base modificada. Las modificaciones de ON compatibles con la formación del complejo de quelato de ON se definen adicionalmente a continuación. Además, la quelación de los cationes metálicos no depende de la secuencia de nucleótidos presentes, sino que en cambio se basa en las características fisicoquímicas comunes a todos los ON (véase la Fig. 2A).

Mientras la formación de complejos de quelatos de ON se puede lograr con cualquier catión metálico divalente, los complejos de quelatos de ON destinados para uso como medicamentos deben contener preferiblemente solo calcio y o magnesio, pero también podría contener hierro, manganeso, cobre o zinc en pequeñas cantidades y no deben incluir cobalto, bario, níquel, cadmio, mercurio, plomo o cualquier otro metal divalente no mencionado aquí.

De manera importante, la formación de complejos de quelatos de ON no se produce con cationes monovalentes tales como Na^+ , K^+ o NH_4^+ y por lo tanto no es probable que se produzca con cualquier catión monovalente. Por lo tanto, el término "sal de ON" se limita más correctamente solo a las sales de ON con cationes monovalentes o con cationes que no forman complejos de quelatos con ON.

Al menos una parte de la interacción transitoria conocida de los ON con componentes proteicos en la sangre probablemente esté mediada por la interacción de los ON con proteínas de unión a metales tales como la albúmina y las proteínas de la cascada de coagulación dependiente de calcio. Por lo tanto, la administración de los ON como complejos quelados (que reducen o eliminan de manera significativa su tendencia a interactuar con proteínas divalentes unidas a metales) puede mitigar estas interacciones de las proteínas en la sangre y dar como resultado menos efectos secundarios con la administración de ON (tal como la anticoagulación transitoria) y también puede aumentar la fracción de dosis de ON que llega a los órganos diana (p. ej., el hígado, los pulmones o el bazo) en comparación con los ON no quelados. Antes de la presente descripción, el impacto de dicha mitigación en la interacción de la proteína en la actividad terapéutica era desconocido y nunca se describió.

La polarización de fluorescencia es una metodología común utilizada para examinar las interacciones intermoleculares. En esta técnica, el cebo (es decir, cualquier ON) se marca con un marcador fluorescente (p. ej., FITC). En disolución, la molécula de cebo cae libremente en disolución debido al movimiento browniano que resulta en una mala emisión de fluorescencia polarizada cuando el cebo se somete a excitación con la longitud de onda correcta de la luz. Con un ligando de peso molecular suficiente (al menos el mismo tamaño que el cebo), la interacción entre el cebo y el ligando presenta una inhibición sustancial del volteo del complejo en disolución. Como resultado de este volteo inhibido en disolución, la emisión de fluorescencia se polariza de manera significativa tras la excitación. Así, con esta técnica, las interacciones pueden ser medidas en disolución sin limitaciones físicas en cada pareja de unión. La polarización de fluorescencia se expresa como la mP adimensional, que es directamente proporcional a la fracción de moléculas de cebo unidas en la reacción. Por ejemplo, si una fracción muy pequeña de moléculas de cebo estuvieran unidas por un ligando particular, habría muy poco de polarización de fluorescencia y los valores de mP en consecuencia serían pequeños. En el otro extremo del espectro, si una gran proporción de moléculas de cebo se unieran por un ligando

particular (o con una mayor concentración de ligando), no habría polarización de fluorescencia sustancial y en consecuencia grandes valores de mP. De esta manera, las isotermas de unión para interacciones particulares de cebo-ligando se pueden generar variando las concentraciones de ligando en presencia de una cantidad fija de cebo marcada fluorescentemente.

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

15 El estándar en la técnica enseña claramente la práctica de la administración de ON a sujetos en necesidad de tratamiento con ON de sales de sodio. Esto se ejemplifica mediante la administración de numerosos ON en ensayos clínicos como sales de sodio que incluyen Fomivirsen (ISIS 2922), Mipomersen (ISIS 301012), Trecovirsen (GEM 91), Custirsén (OGX-011/ISIS 112989), Genasense (G3139), Aprinocarsem (ISIS 3531/LY 900003), PRO-51 (GSK 2402968) y ALN-RSV01 (Geary et al., 2002, Clin. Pharmacokinetics, 41: 255-260; Yu et al., 2009, Clin. Pharmacokinetics, 48: 39-50; Sereni et al., 1999, J. Clin. Pharmacol., 39: 47-54; Chi et al., 2005, J. Nat. Canc. Inst., 97: 1287-1296; Marshall et al., 2004, Ann. Oncol., 15: 1274-1283; Grossman et al., 2004, Neuro-Oncol, 6: 32-40; Goemans et al., 2011 NEJM 364: 1513-1522) Actualmente no hay datos publicados que enseñen la formulación de oligonucleótidos para ninguna vía de administración parenteral con el uso de calcio o magnesio o cualesquiera otros metales divalentes.

25 Muchos de los efectos secundarios asociados con la administración de ON de sales de sodio se pueden atribuir a sus efectos de quelación. La anticoagulación de la sangre por los ON está causada, al menos en parte, por la quelación del calcio sérico por los ON, lo que perjudica la cascada de coagulación dependiente de calcio. La quelación del calcio sérico y la hipocalcemia sérica subyacente que puede causar también es consistente con los efectos secundarios observados con la administración de los ON por administración IV, que incluye fiebre, escalofríos, debilidad y disminución de la presión arterial (la última con infusión o inyección IV rápida). Las reacciones en el sitio de inyección observadas con inyecciones subcutáneas de ON (induración, inflamación, sensibilidad y dolor) se deben al menos en parte a la quelación local por los ON de calcio y posiblemente otros cationes divalentes tales como el magnesio o los cationes multivalentes en el sitio de inyección. Se ha demostrado que la administración de los ON como complejos quelados mitiga muchos de estos efectos secundarios (véase el documento WO 2012/021985).

35 El término oligonucleótido (ON) se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN). Este término incluye ON compuestos de nucleobases modificadas (incluyendo 5' metilcitosina y 4' tiouracilo), azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (cadena principal), así como los ON que tienen partes no de origen natural que funcionan de manera similar. Tales ON modificados o sustituidos se pueden preferir respecto a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, inmunorreactividad reducida, captación celular mejorada, afinidad mejorada para el ácido nucleico diana y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas. Los ON también pueden ser de doble cadena.

40 Los ON pueden incluir diversas modificaciones, p. ej., modificaciones estabilizantes, y por lo tanto pueden incluir al menos una modificación en el enlace fosfodiéster y/o en el azúcar y/o en la base. Por ejemplo, el ON puede incluir, sin restricción, una o más modificaciones, o ser completamente modificado para contener todos los enlaces o azúcares o bases con las modificaciones mencionadas. Los enlaces modificados pueden incluir enlaces de fosforotioato, 45 enlaces de fosforditioato y/o enlaces de metilfosfonato. Mientras que los enlaces modificados son útiles, los ON pueden incluir enlaces fosfodiéster. Modificaciones útiles adicionales incluyen, sin restricción, las modificaciones en la posición 2' del azúcar que incluyen modificaciones 2'-O-alkilo tales como modificaciones 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2' MOE), modificaciones 2'-amino, modificaciones 2'-halo tales como 2'-fluoro; y/o análogos de nucleótidos acíclicos. Otras modificaciones 2' también son conocidas en la técnica y se pueden utilizar tales como ácidos nucleicos bloqueados. En particular, el ON tiene enlaces modificados a lo largo de o tiene todos los enlaces modificados, p. ej., 50 fosforotioato; tiene un 3' y/o 5'-cap; incluye un enlace 3'-5' terminal; el ON es o incluye un concatémero que consta de dos o más secuencias de ON unidas por uno o más enlazador(es). Las modificaciones de la base pueden incluir 5' metilación de la base de citosina (5' metilcitosina o en el contexto de un nucleótido, 5' metilcitolina) y/o 4' tioación de la base de uracilo (4' tiouracilo o en el contexto de un nucleótido, 4' tiouridina). Se pueden combinar diferentes enlaces modificados químicamente compatibles cuando las condiciones de síntesis son químicamente compatibles, tales como tener un oligonucleótido con enlaces de fosforotioato, una modificación 2' ribosa (como 2'O-metilación) y una base modificada (tal como 5' metilcitosina). El ON se puede modificar además por completo con todas estas modificaciones diferentes (p. ej., siendo modificado cada enlace fosforotioado, cada ribosa 2' modificada y cada base).

60 En la presente descripción, el término "ON antiviral" se refiere a cualquier ON que en virtud de su actividad bioquímica específica (ya sea dependiente de la secuencia o independiente de la secuencia) tiene la capacidad de inhibir directa

o indirectamente algún aspecto de la replicación viral o de mejorar directa o indirectamente la capacidad del huésped para eliminar la infección mediante mecanismos inmunológicos u otros.

5 En la presente descripción, el término "complejo de quelato de ON antiviral" se refiere a un complejo de dos o más ON antivirales en disolución unidos intermolecularmente por un catión metálico multivalente. El complejo de quelato de ON antiviral puede contener dos o más ON con diferentes secuencias.

En la presente descripción, el término "ON anti-colesterol" se refiere a cualquier ON que en virtud de su actividad bioquímica específica (ya sea dependiente de secuencia o independiente de secuencia) tiene la capacidad de reducir directa o indirectamente el colesterol sérico total anormalmente elevado y o niveles séricos de lipoproteínas de baja/muy baja densidad en un sujeto.

10 En la presente descripción, el término "complejo de quelato de ON anti-colesterol" se refiere a un complejo de dos o más ON anti-colesterol unidos intermolecularmente por un catión metálico multivalente. El complejo de quelato de ON anti-colesterol puede contener dos o más ON con diferentes secuencias.

15 En la presente descripción, el término "ON anti-triglicérido" se refiere a cualquier ON que en virtud de su actividad bioquímica específica (ya sea dependiente de secuencia o independiente de secuencia) tiene la capacidad de reducir directa o indirectamente los niveles de triglicéridos séricos anormalmente elevados en un sujeto.

En la presente descripción, el término "complejo de quelato de ON anti-triglicérido" se refiere a un complejo de dos o más ON anti-triglicérido unidos intermolecularmente por un catión metálico multivalente. El complejo de quelato de ON anti-triglicérido puede contener dos o más ON con diferentes secuencias.

20 En la presente descripción, el término "ON anti-Alzheimer" se refiere a cualquier ON que en virtud de su actividad bioquímica específica (ya sea dependiente de secuencia o independiente de secuencia) tiene la capacidad de:

A. detener, retrasar o revertir directa o indirectamente la acumulación o expresión de β -amiloide en el cerebro;

B. detener, retardar o revertir directa o indirectamente la formación o el crecimiento de la placa de Alzheimer en el cerebro; y/o

25 C. detener, retardar o revertir directa o indirectamente la disfunción neurológica asociada con la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

En la presente descripción, el término "complejo de quelato de ON anti-Alzheimer" se refiere a un complejo de dos o más ON anti-Alzheimer unidos intermolecularmente por un catión metálico multivalente.

En la presente descripción, el término "ON anti-priones" se refiere a cualquier ON que en virtud de su actividad bioquímica específica (ya sea dependiente de secuencia o independiente de secuencia) tiene la capacidad de:

30 A. detener, retrasar o revertir directa o indirectamente la formación de proteínas priónicas en la periferia o en el cerebro; y/o

B. detener, retrasar o revertir directa o indirectamente la disfunción neurológica asociada con la enfermedad por priones.

35 En la presente descripción, el término "complejo de quelato de ON anti-priones" se refiere a un complejo de dos o más ON anti-priones unidos intermolecularmente por un catión metálico multivalente. El complejo de quelato de ON anti-priones puede contener dos o más ON con diferentes secuencias.

40 En la presente solicitud, la expresión "ON degenerado" se pretende que signifique un ON de cadena sencilla que tiene una oscilación (N) en cada posición, tal como NNNNNNNNNN. Cada base se sintetiza como una oscilación tal que este ON en realidad existe como una población de diferentes secuencias generadas al azar de la misma longitud y propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, para un ON degenerado de 40 bases de longitud, cualquier secuencia particular en la población sería teóricamente representada sólo por $1/4^{40}$ o $8,3 \times 10^{-25}$ de la fracción total. Dado que $1 \text{ mol} = 6,022 \times 10^{23}$ moléculas, y el hecho de que 1 mol de un ON de 40mer tendría una masa de aproximadamente 12-14 kg (dependiendo de la secuencia y las modificaciones presentes), cualquier ON con una secuencia específica presente de manera efectiva no existe más de una vez en cualquier preparación. Por lo tanto, cualquier formación de

45 quelatos o actividad biológica observada en tal preparación debe ser debida a las propiedades fisicoquímicas no dependientes de la secuencia (o independiente de la secuencia) de los ON ya que cualquier ON particular de una secuencia definida, siendo único en la preparación, no se puede esperar que contribuya a ninguna actividad derivada de su secuencia de nucleótidos específica.

50 Como ilustración adicional de este concepto, el Ejemplo I compara la caracterización de REP 2006 (un ON de 40mer con una secuencia fosforotioada completamente degenerada) con un ON de 21mer de una secuencia definida (también fosforotioada completamente) por cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas y muestra claramente que cualquier ON con un tamaño similar y modificación química (es decir, fosforotiolación) tendrá

características fisicoquímicas muy similares (si no idénticas) que no estarán afectadas por la secuencia de nucleótidos presentes. (Véanse las Figs. 1A-C).

En la presente solicitud, el término "polímero de ácido nucleico" o NAP se pretende que identifique cualquier ON de cadena sencilla que no contenga funcionalidad específica de secuencia. La actividad bioquímica de los NAP no depende del reconocimiento del receptor tipo Toll de los ON, la hibridación con un ácido nucleico diana o la interacción aptámerica que requiere una estructura ON terciaria secundaria específica derivada de un orden específico de nucleótidos presentes. Los NAP pueden incluir modificaciones de base y/o enlaces y/o azúcar como se describe anteriormente.

Los ON pueden ejercer sus efectos mediante numerosos mecanismos que son o dependientes de la secuencia o independientes de la secuencia. Los mecanismos dependientes de la secuencia son aquellos que requieren una secuencia específica de ácido nucleico para su actividad y donde la actividad se reduce por una o más alteraciones en la secuencia de nucleótidos presente. Esta secuencia específica puede abarcar toda la longitud del ON o solo una parte de ella (un motivo de secuencia). Ejemplos de ON dependientes de secuencia incluyen:

1. Los ON antisentido (ya sea de cadena sencilla o de doble cadena (p. ej., ARN interferente pequeño (ARNip) o ARN de horquilla pequeña (ARNhp)) son complementarios a una parte específica de un ARN mensajero (ARNm) (es decir, un ARNm viral o ARNm huésped) implicado en un estado de enfermedad (es decir, infección viral o regulación del colesterol) y cuando se introducen en una célula, dirigen la degradación de estos ARNm diana por la ARNasa H o el complejo silenciador inducido por ARN (RISC).

2. Los ON de bloqueo esteárico son ON antisentido de cadena sencilla que son complementarios a una parte específica de un ARNm pero que están diseñados para no activar la ARNasa H. La hibridación de estos ON a su ARNm diana da como resultado una estructura de doble cadena que proporciona un impedimento esteárico a las proteínas que normalmente actúan sobre el ARNm. Tales ON se pueden emplear para bloquear la traducción de un ARNm particular o para interferir con el empalme y la maduración postranscripcionales de un ARNm particular. Tales ON se pueden diseñar para bloquear la activación de la ARNasa H (ya que no es parte integral del mecanismo de acción de estos ON) mediante modificaciones 2' ribosa a lo largo o en cada ribosa presente en el ON (tal como la 2'-O-metilación).

3. Los aptámeros son ON que adoptan una conformación tridimensional específica capaces de interacciones protéicas específicas (es decir, con una proteína viral o proteína huésped) y que no interactúan fácilmente con el ADN o ARN huésped. Los aptámeros también pueden incluir spiegelmers, que utilizan L-nucleótidos para conferir resistencia a la degradación de nucleasas del ON.

4. Los ON inmunoestimuladores utilizan un motivo de ácido nucleico 6mer específico (XXCGXX) para estimular la respuesta inmune en mamíferos. El motivo óptimo varía de una especie a otra, pero depende estrictamente de una secuencia específica que se adapta al motivo XXCGXX.

5. Los micro-ARN (ARNmi) se unen y bloquean la función de los ARNmi de origen natural que están implicados en un estado de enfermedad (es decir, replicación viral o regulación del colesterol).

Los ON antisentido se pueden aplicar a diversos estados de enfermedad, tales como la actividad viral dirigida catalizando la degradación de un ARNm viral (p. ej., ALN-RSV01; Zamora et al., 2011, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 183: 531-538) o dirigidas a la producción de LDL y VLDL catalizando la degradación de la ApoB100 del ARNm (p. ej., mipomersen [Kynamro™]; Raal et al., 2010, Lancet 375: 998-1006). Los ON antisentido también se pueden utilizar para corregir el empalme incorrecto de las transcripciones de genes que pueden producir proteínas aberrantes, tal como la corrección del empalme incorrecto de la transcripción del gen distrofina que se produce en la distrofia muscular de Duchenne (p. ej., PRO-051, Goemans et al., 2011, NEJM 364: 1513-1522).

Los ARNmi se pueden aplicar a diversos estados de enfermedad, tales como la hibridación y la catalización de la degradación del miR-122 de origen natural en la célula, que está implicado tanto en la regulación de la producción de LDL y VLDL así como en la producción de hepatitis C (p. ej., miravirsen: Janssen et al., Mar 27 2013 NEJM, epub ahead of print).

El único ejemplo descrito de ON independientes de secuencia son los NAP fosforotioados, que interactúan selectivamente con estructuras de proteínas anfipáticas de una manera dependiente del tamaño (longitud) en virtud de sus propiedades fisicoquímicas como polímeros anfipáticos (véase, p. ej. la patente de EE.UU. n.º. 8,008,269).

Se esperará que cualquier ON, independientemente de cómo ejerza su efecto biológico en un contexto fisiológico, forme interacciones mediadas por cationes divalentes a la entrada del oligonucleótido en la circulación sanguínea, que contiene algunos cationes divalentes o trivalentes libres, pero donde la mayor parte de los metales divalentes del suero se unen a proteínas (p. ej., calcio unido a proteínas de unión de calcio, tal como la albúmina, trombina y fibrinógeno). Por lo tanto, es probable que una parte significativa de las interacciones oligo mediadas por metales divalentes sean con proteínas en lugar de con otro oligonucleótido (en un complejo de quelato) en un escenario in vivo. Ya que se ha demostrado que numerosos ON tienen una función predecible cuando se administran in vivo según su diseño (ya sea como antisentido de cadena sencilla, ARNip, ARNhp o ARNmi), estas interacciones de las proteínas mediadas por

calcio, mientras que tienen un impacto en los aspectos de tolerabilidad de los ON (como se describe en la publicación de solicitud internacional no. WO2012/021985 y la publicación de solicitud de EE.UU. n° 2012/0046348) parecen ser reversibles para no impedir la acumulación en los órganos de los ON, el transporte intracelular de los ON y la interacción de estos ON con sus ácidos nucleicos correspondientes in vivo. La reversibilidad de estas interacciones podría haberse predicho razonablemente que dependía de estas interacciones de las oligoproteínas mediadas por metales divalentes. Como la administración de complejos de quelatos de oligonucleótidos probablemente interferirá con estas interacciones de las proteínas (como se describe en la publicación de solicitud de EE.UU. n° 2012/0046348), un experto en la técnica predeciría razonablemente que la administración de complejos de quelatos de ON cambiaría los comportamientos farmacocinéticos (y la acumulación en el órgano) de los ON, especialmente los ON fosforotioados (PS-ON) que se conoce que se acumulan en el riñón, el hígado, los pulmones y el bazo y que en la técnica se acepta que dependen de las interacciones ON-proteína.

Además, la preparación de complejos de quelatos de ON como se describe en la publicación de solicitud de EE.UU. n° 2012/0046348 implica que los ON interactúan en ausencia de cualquier proteína y en presencia de concentraciones de cationes metálicos divalentes a concentraciones más altas que las normalmente presentes en la circulación sanguínea y se predeciría razonablemente a partir de la técnica que se enseña como se describe en la publicación de solicitud de EE.UU. n° 2012/0046348 que estos complejos de quelatos de ON perderían su capacidad de interactuar normalmente con proteínas en la sangre (todos los ON deben pasar por de la circulación sanguínea independientemente de su destino final in vivo). Por lo tanto, mientras la administración de un complejo de quelato de ON evitará o mitigará el comportamiento de quelación de los ON in vivo y así mitigará los efectos secundarios que surgen de los efectos de quelación del oligo, no era predecible ni evidente antes de la presente descripción habilitante si el ON utilizado para preparar formulaciones de complejo de quelato de ON (que se formaron ex vivo y en un entorno no fisiológico) conservaría su acumulación y funcionalidad del órgano específico cuando se administra como un complejo de quelato (comparado con la actividad del ON cuando se administraba a un sujeto como una sal de sodio). Como el complejo de quelato de ON no se formó in vivo, podía no ser capaz de disociarse y o ser transportado intracelularmente y o adoptar la proteína correcta u otras interacciones bioquímicas in vivo para ejercer su función (p. ej., reasociación de una cadena complementaria de ADN o ARN o interactuando con una hélice anfipática en una proteína o formando una secuencia de interacción aptamérica específica con una proteína específica). Además, la administración de un complejo de quelato de ON preformado podría dar como resultado una acumulación reducida en la ubicación requerida en el sujeto huésped en comparación con el mismo ON cuando se administra como una sal de ON simple. Por lo tanto, no era obvio antes de las descripciones en la presente memoria que cualquier complejo de quelato de ON particular conservara la funcionalidad bioquímica de su progenitor de sal de ON no quelado cuando se introduce en un entorno fisiológico o cuando se administra a un sujeto.

Además, debido a que las propiedades de quelación y la capacidad de formar complejos de quelatos con metales divalentes en disolución son inherentes a cualquier ON, la demostración de la retención de actividad biológica con cualquier ON específico cuando se administra como complejo de quelato proporcionará evidencia clara y enseñará que la actividad biológica de cualquier ON se conservará cuando se administre como un complejo de quelato, independientemente de su modo de acción específico o enfermedad diana.

Actualmente están en desarrollo varios fármacos antivirales basados en ON para el tratamiento de infecciones virales que incluyen los NAP REP 9AC (REP 2055 o SEQ ID NO: 2, REP 9AC' (REP 2139 o SEQ ID NO: 18) y REP 9AC-m (REP 2148 o SEQ ID NO: 11) para el tratamiento del HBV, miravirsén para el tratamiento del HCV y ALN-RSV01 para el tratamiento del virus sincitial respiratorio (RSV). Cada uno de estos ON tiene un mecanismo de acción diferente: los polímeros basados en ácidos nucleicos bloquean la entrada viral del HBV y también evitan la liberación de la proteína del antígeno de superficie del HBV (HBsAg) en la sangre (una proteína que inhibe la función inmune), miravirsén (un ARNm) bloquea la acción del micro-ARN mir-122 que se conoce que desempeña un papel en la replicación del HCV y ALN-RSV01 (un ARNip) bloquea la síntesis de la proteína de la cápside del RSV, evitando la producción de viriones del RSV. Todos estos fármacos de ON son muy efectivos en producir sus efectos pretendidos en los sujetos: REP 9AC/REP 9AC' funciona bien para eliminar la HBsAg de la sangre, miravirsén funciona bien para inhibir la función mir-122 y ALN-RSV-01 funciona bien para bloquear la producción de proteínas de la cápside. Sin embargo, en todos los casos donde estos compuestos basados en ON se administran por vía parenteral, están asociados con efectos secundarios relacionados con la administración, como fiebre, escalofríos, temblores cuando se administran por infusión intravenosa o por dolor, inflamación o induración en el sitio de inyección cuando se administran por administración subcutánea.

Varios ON han demostrado eficacia en pacientes humanos en el tratamiento de la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Estos son mipomersén (Kynamro™), un oligonucleótido antisentido de segunda generación que dirige la síntesis de Apo B100, PCS-GalNAc, un ARNip conjugado con azúcar que dirige las PCSK9 y NAP (véase el Ejemplo V).

También se ha demostrado que los NAP pueden prevenir el desarrollo de la enfermedad por priones in vitro e in vivo en animales (Kocisko et al., 2006, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 1034-1044).

El uso de oligonucleótidos para corregir el empalme de ARN aberrante en estados de enfermedad también es una intervención terapéutica aceptada en diversos estados de enfermedad (Du and Gatti, 2009, *Curr. Op. Mol. Ther.*, 11: 116-123). En el caso de la distrofia muscular de Duchene, el oligonucleótido PRO-051 está diseñado para unirse al

ARN de distrofina durante la maduración e inducir la omisión del exón 51 en el ARNm maduro que restaura la producción normal de distrofina en la fibra muscular enferma (Goemans et al., 2011, NEJM 364: 1513-1522) Sin embargo, la administración clásica de PRO-051 se acompaña de reacciones en el sitio de inyección que resultan, al menos en parte, debido a las propiedades mediadas por la quelación de los ON como se describe en la publicación de solicitud de EE.UU. n° 2012/0046348.

5 Es deseable preparar cualquiera de estos fármacos basados en ON como quelatos de ON para minimizar sus efectos secundarios relacionados con la administración, siempre que puedan conservar su funcionalidad bioquímica. Las presentes descripciones demuestran que los ON se pueden preparar como complejos de quelatos y aún conservar su funcionalidad bioquímica. El complejo de quelato de ON en la formulación se puede derivar de cualquier ON con actividad antiviral, ejemplos de los cuales se proporcionan en la tabla 1.

10

Tabla 1

Ejemplos de ON que se pueden preparar como complejos de quelatos.

Clase de ON	Tipo de ácido nucleico	Secuencia (5'-3')	Modificaciones
NAP	ADN	(AC) ₂₀ (SEQ ID NO: 2)	Todos los enlaces PS
NAP	ADN	(CA) ₂₀ (SEQ ID NO: 10)	Todos los enlaces PS
NAP	ADN	(A-5'MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 11)	Todos los enlaces PS
NAP	ADN	(5'MeC-A) ₂₀ (SEQ ID NO: 12)	Todos los enlaces PS
NAP	ARN	(2'OMeA-2'OMeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 13)	Todos los enlaces PS
NAP	ARN	(2'OMeC-2'OMeA) ₂₀ (SEQ ID NO: 14)	Todos los enlaces PS
NAP	ADN	(AG) ₂₀ (SEQ ID NO: 3)	Todos los enlaces PS
NAP	ADN	(GA) ₂₀ (SEQ ID NO: 15)	Todos los enlaces PS
NAP	ADN	C ₄₀ (SEQ ID NO: 1)	Todos los enlaces PS
NAP	ADN	(TC) ₂₀ (SEQ ID NO: 5)	Todos los enlaces PS
NAP	ADN	(CT) ₂₀ (SEQ ID NO: 16)	Todos los enlaces PS

ES 2 767 333 T3

Clase de ON	Tipo de ácido nucleico	Secuencia (5'-3')	Modificaciones
NAP	ADN	(TG) ₂₀ (SEQ ID NO: 6)	Todos los enlaces PS
NAP	ADN	(GT) ₂₀ (SEQ ID NO: 17)	Todos los enlaces PS
NAP	ARN	(2'OMe, 5'MeC-2'OMeA) ₂₀ (SEQ ID NO: 4)	Todos los enlaces PS
NAP	ARN	(2'OMeA-2'OMe, 5'MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 18)	Todos los enlaces PS
ARNmi	LNA/ADN	CCATTGTCACA^mCTC^mCA (SEQ ID NO: 7)	Todos los enlaces PS LNA en negrita 0(^m C=5'MeC)
ARNmi	ADN/ARN	Secuencia correspondiente a un micro ARN huésped	Todos los enlaces PS pueden contener LNA o ARN con modificación 2 'ribosa
antisentido	ADN/ARN	Secuencia correspondiente a un ARNm viral o huésped o transcripto génico	Todos los enlaces PS pueden contener una porción o todo el ARN con modificación 2 'ribosa
ARNip/ARNhp	ARN/ADN de doble cadena	Secuencia correspondiente a la proteína HBV X	Puede contener ARN con modificación 2 'ribosa, puede contener PS
ARNip	ARN/ADN de doble cadena	GGCUCCUUAGCAAAGUCAAG _d T _d T (SEQ NO: 8) + CUUGACUUUGCUAAGAGCC _d T _d T (SEQ ID NO: 9)	Todo el ARN excepto la desoxitimidina (_d T), puede contener PS
		Secuencia correspondiente al ARNm para el ARNm de la proteína N de RSV	

Clase de ON	Tipo de ácido nucleico	Secuencia (5'-3')	Modificaciones
ARNip/ARNhp	ARN/ADN de doble cadena	Secuencia correspondiente a un ARNm viral	Puede contener ARN con la modificación 2' ribosa, puede contener PS
antisentido	ARN/ADN	GCCTCAGTCTG^mCTT^mCGCACC (SEQ ID NO: 20)	Todos los enlaces PS 2'MOE ARN en negrita (^m C=5'MeC)
antisentido	ARN o ADN	dirigido a PKCS9	Todos los enlaces PS, pueden contener 5'MeC
ARNip	ARN/ADN de doble cadena	dirigido a PKCS9	Puede contener ARN con la modificación 2' ribosa, puede contener PS, puede contener conjugados GalNAc
antisentido	ARN	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU (SEQ ID NO: 19)	Todos los enlaces PS, todas las ribosas 2' O metiladas

LNA=ácido nucleico bloqueado, PS=fosforotioato, 2'OMe=2' O metilo, 2'MOE=2'metoxietilo, 5'MeC=5' metilcitosina

Además, las composiciones anteriores pueden incluir portadores, adyuvantes, vehículos y/o excipientes fisiológica y/o farmacéuticamente aceptables. Las características del portador pueden depender de la ruta de administración. Los términos "portador, adyuvante, vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refieren a un portador, adyuvante, vehículo o excipiente que se puede administrar a un sujeto, incorporado a una composición descrita en la presente memoria, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo. Portadores, adyuvantes, vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes ("SEDDS"), tensioactivos utilizados en formas de dosificación farmacéuticas tales como Tweens u otras matrices de suministro polimérico similares, proteínas séricas tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato potásico, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno polioxipropileno, polietilenglicol, grasa de lana, caprato de sodio o tetradecilmaltósido (TDM), derivados de TDM u otros sacáridos alquilados. Ciclodextrinas tales como α -, β - y γ -cidodextrina, o derivados modificados químicamente tales como hidroxialquilciclodextrinas, que incluye 2 y 3-hidroxiopropil- β -ciclodextrinas, u otros derivados solubilizados se pueden utilizar también para mejorar la administración de las composiciones descritas en la presente memoria.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden contener otros agentes terapéuticos como se describe a continuación, y se pueden formular, por ejemplo, empleando vehículos o diluyentes sólidos o líquidos convencionales, así como aditivos farmacéuticos de un tipo apropiado al modo de administración deseado (por ejemplo, excipientes, aglutinantes, conservantes, estabilizantes, sabores, etc.) según las técnicas tales como las bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica.

Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden administrar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por vía oral, tal como en forma de suspensiones líquidas, comprimidos, cápsulas, gránulos o polvos; sublingualmente, bucalmente parenteralmente, tal como por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o técnicas de infusión (p. ej., como disoluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no acuosas); nasalmente tal como por inhalación en aerosol; localmente, tal como en forma de crema o pomada; o rectalmente tal como en forma de supositorios o enema; en formulaciones de unidades de dosificación que contienen vehículos o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables. Las presentes composiciones pueden, por ejemplo, administrarse en una forma adecuada para la liberación inmediata o liberación prolongada. La liberación inmediata o la liberación prolongada se puede lograr mediante el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas, o, de manera particular en el caso de la liberación prolongada, mediante el uso de dispositivos tales como implantes subcutáneos o bombas osmóticas. Por lo tanto, las composiciones anteriores se pueden adaptar para la administración por cualquiera de las siguientes rutas: intraocular, ingestión oral, entérica, inhalación, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección o infusión intratecal, intratraqueal, inyección o infusión intravenosa, o localmente.

Las composiciones ejemplares para la administración oral incluyen suspensiones que pueden contener, por ejemplo, celulosa microcristalina para dar volumen, ácido algínico o alginato de sodio como un agente de suspensión, metilcelulosa como un potenciador de la viscosidad y edulcorantes o agentes saborizantes tales como los conocidos en la técnica; y comprimidos de liberación inmediata que pueden contener, por ejemplo, celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y/o lactosa y/u otros excipientes, aglutinantes, expansores, desintegrantes, diluyentes y lubricantes tales como los conocidos en la técnica. Las presentes composiciones también se pueden administrar a través de la cavidad oral mediante administración sublingual y/o bucal. Los comprimidos moldeados, los comprimidos comprimidos o los comprimidos liofilizados son formas ejemplares que se pueden utilizar. Las composiciones ejemplares incluyen aquellas que formulan las presentes composiciones con diluyentes de disolución rápida tales como manitol, lactosa, sacarosa y/o ciclodextrinas. También incluidos en tales formulaciones pueden estar excipientes de alto peso molecular tales como celulosas (avicel) o los polietilenglicoles (PEG). Dichas formulaciones también pueden incluir un excipiente para ayudar a la adhesión a la mucosa, tal como hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa de sodio (SCMC), copolímero de anhídrido maleico (p. ej., Gantrez) y agentes para controlar la liberación tales como copolímero poliacrílico (p. ej., Carbopol 934). También se pueden añadir lubricantes, deslizantes, sabores, agentes colorantes y estabilizadores para facilitar la fabricación y el uso.

Un experto en la materia puede determinar la cantidad efectiva de un compuesto descrito en la presente memoria, e incluye cantidades de dosificación ejemplares para un ser humano adulto de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal de compuesto activo por día, que se puede administrar en una dosis única o en forma de dosis divididas individuales, tales como de 1 a 5 veces por día o en dosis administradas en múltiples ocasiones durante una semana particular de administración. Se entenderá que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier sujeto particular pueden variar y dependerán de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la especie, edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, el modo y el tiempo de administración, la tasa de excreción y el aclaramiento, la combinación de fármacos y la gravedad de la afección particular. Los sujetos preferidos para el tratamiento incluyen animales, más preferiblemente especies de mamíferos tales como seres humanos, y animales domésticos tales como perros, gatos y similares.

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

Ejemplo I

Formación de complejos de quelatos de ON

La Fig. 1A detalla la separación por HPLC (utilizando una columna hidrófoba) de dos preparaciones de ON que se coinyectan en la columna al mismo tiempo. La primera de ellas se llama el estándar interno y es un ON de fosforotioato de 21mer con una secuencia específica definida, la segunda es REP 2006 (un ON de fosforotioato de 40mer degenerado). Ambas especies se separan en distintos picos definidos basados solo en sus propiedades fisicoquímicas (es decir, tamaño e hidrofobicidad); la secuencia de nucleótidos presentes en cada uno de estos ON no tiene un impacto significativo en sus propiedades fisicoquímicas y, por lo tanto, no tiene impacto en su separación. Como tal, el patrón interno se eluye de la columna como un pico bien definido con tiempo de retención menor en comparación con REP 2006, solo se debe a la diferencia en el tamaño de estos dos polímeros ON. Téngase en cuenta que los hombros a cada lado del pico REP 2006 se deben a secuencias de fallo típicas en la producción de ON más largos. A pesar de la naturaleza heterogénea de la secuencia de REP 2006, se resuelve de manera similar como un pico bien definido por HPLC como la secuencia específica de 21mer que ilustra las propiedades fisicoquímicas comunes de todas las especies en la preparación de REP 2006, a pesar de que hay un número muy grande de diferentes secuencias presentes. Después de la separación por HPLC de los picos REP 2006 y 21-mer, estos se pueden someter a espectroscopía de masas (MS) para identificar las especies presentes dentro de estos picos definidos (Figs. 1B y 1C).

En la Fig. 1B, el 21mer se resuelve en una sola especie con PM 7402,6 Da, consistente con este PS-ON que tiene una secuencia definida. Sin embargo, el análisis de MS de REP 2006 (Fig. 1C) revela un número extremadamente grande de especies presentes cuyo rango de masa tiene una distribución normal casi perfecta, de acuerdo con su naturaleza completamente degenerada. Este rango de masas va desde C₄₀ (la especie más pequeña) a A₄₀ (la especie más grande) y la prevalencia de estas especies es extremadamente pequeña con el número de especies en aumento (intensidad máxima) cuando su masa se acerca al centro del rango de masas. Esto se debe a que un número cada vez mayor de diferentes secuencias dará como resultado una masa similar. El hecho de que todas las especies ON diferentes presentes en REP 2006 tengan el mismo tiempo de retención en una columna hidrofóbica durante la separación por HPLC demuestra claramente que todos los ON del mismo tamaño y con las mismas modificaciones químicas (es decir, fosforotioación) tendrán propiedades fisicoquímicas muy similares (si no idénticas) y, como tal, se pueden considerar funcionalmente similares en cualquier aplicación o propiedad que no dependa de la secuencia de nucleótidos presentes en una molécula ON particular. Por lo tanto, cualquier formación de complejo de quelato de ON observado con cualquier ON degenerado particular (p. ej., REP 2003, REP 2004, véase la Tabla 2), no puede depender de la secuencia de ON presente y debe depender de las propiedades fisicoquímicas conservadas de cualquier ON.

5 La interacción de las sales de amonio de ON con diversos cationes metálicos divalentes se examinó mediante polarización de fluorescencia (FP) como se describe anteriormente. Durante la síntesis de ON, cada ON se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en el extremo 3' mediante un enlace rígido en el carbono 3 empleando reactivos y protocolos de síntesis bien establecidos. Estos ON se escindieron de la síntesis y se dejaron como sales de amonio. Los ON utilizados en este ejemplo se describen en la Tabla 2.

Tabla 2
ON de cadena sencilla utilizados en el Ejemplo I

ON	Secuencia (5'-3')	Modificaciones
REP 2032-FL	N ₆	PS (ADN)
REP 2003-FL	N ₁₀	PS (ADN)
REP 2004-FL	N ₂₀	PS (ADN)
REP 2006-FL	N ₄₀	PS (ADN)
REP 2107-FL	N ₄₀	PS + 2 'O Me (ARN)
REP 2086-FL	N ₄₀	2' O Me (ARN)
REP 2031-FL	C ₄₀ (SEQ ID NO: 1)	PS (ADN)
REP 2055-FL	(AC) ₂₀ (SEQ ID NO: 2)	PS (ADN)
REP 2057-FL	(AG) ₂₀ (SEQ ID NO: 3)	PS (ADN)
REP 2139-FL	(2'OMeA-2'OMe, 5'MeC) ₂₀ (SEQ ID NO: 18)	PS + 2'OMe (ARN)

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

PS=fosforotioación en cada enlace

10 2' O Me=2 'O metilación en cada ribosa

Los ON 3' FITC marcados utilizados fueron REP 2032-FL (un oligodesoxinucleótido degenerado fosforotioado de 6mer), REP 2003-FL (un ON de ADN degenerado fosforotioado de 10mer), REP 2004-FL (un oligodesoxinucleótido degenerado fosforotioado de 20mer), REP 2006-FL (un ON de AND degenerado fosforotioado de 40mer), REP 2031-FL (un ON de ADN fosforotioado de policitidina de 40mer; SEQ ID NO: 1), REP 2107-FL (un ON de ARN degenerado fosforotioado de 40mer que tiene cada ribosa modificada por 2 'O metilación), REP 2086-FL (un ARN de ON de fosfodiéster degenerado de 40mer que tiene cada ribosa modificada por 2 'O metilación), REP 2055-FL (un ON de ADN fosforotioado con secuencia [AC]₂₀; SEQ ID NO: 2), REP 2057 (un ON de ADN fosforotioado con secuencia [AG]₂₀; SEQ ID NO: 3) y REP 2139-FL (un ON de ARN fosforotioado con secuencia [2'OMeA-2'OMe, 5'MeC]₂₀ que tiene cada ribosa 2 'O metilo modificada y cada citosina 5' metilada; SEQ ID NO: 18). Cada uno de estos ON se preparó como una disolución madre de 0,5 mM en TRIS 1 mM (pH 7,2). Estas disoluciones madres se utilizaron para preparar disoluciones ON fluorescentes 3 nM en tampón FP (TRIS 10 mM, NaCl 80 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM y Tween®-20 al 0,1%). El EDTA estaba presente para eliminar cualesquiera metales divalentes presentes en la disolución antes de las mediciones de FP. Cada una de estas disoluciones tampón también contenía NaCl 80 mM para evaluar la formación del complejo de ON en presencia de un exceso molar de cationes monovalentes. A cada ON fluorescente en disolución se añadieron diversas cantidades de sales de cloruro de grado ACS de metales divalentes (2+) (como se describe en la Tabla 3). La formación de dímeros o complejos de quelatos de ON de orden superior se controló mediante un aumento en la polarización de fluorescencia (cuantificada por la unidad adimensional

"mP") de modo que el aumento de la formación de complejos de quelatos de ON dio como resultado cambios más grandes en la masa (véase la Fig. 3). Este volteo más lento resultante de estos complejos de quelatos de ON en disolución conduce a un aumento de la polarización de fluorescencia (véase la Fig. 4). Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3
Formación de quelatos de ON con diversos ON y metales divalentes

ON	polarización de fluorescencia (mP)											
	calcio (como CaCl ₂)				magnesio (como MgCl ₂)				hierro (como FeCl ₂)			
	ausente		presente		ausente		presente		ausente		presente	
	promed.	desv. est.	promed.	desv. est.	promed.	desv. est.	promed.	desv. est.	promed.	desv. est.	promed.	desv. est.
REP 2032-FL	88,0	4,2	102,5	3,5	86*	ND*	103,5	3,5	92,0	7,1	184,5	31,8
REP 2003-FL	68,0	4,2	100,0	9,9	66,5	9,2	92,0	2,8	60,5	10,6	117,5	16,3
REP 2004-FL	74,5	0,7	123,0	0,0	72,5	2,1	112,5	3,5	60,5	3,5	144,0	19,8
REP 2006-FL	92,0	4,2	182,5	4,9	97,0	2,8	175,5	0,7	81,5	12,0	123,0	7,1
REP 2107-FL	73,0	15,6	95,5	0,7	67,5	3,5	87,5	3,5	61,5	3,5	117,5	13,4
REP 2031-FL	58,5	23,3	114,5	2,1	52,5	3,5	89,5	2,1	51,0	7,1	102,0	2,8
REP 2086-FL	77,0	28,3	119,5	2,1	70,0	12,7	114,0	2,8	59,5	4,9	87,0	7,1
REP 2055-FL	48	5,7	172	15,6	60,0	2,8	151,0	7,8	ND	ND	ND	ND
REP 2057-FL	59,5	1,4	152,5	6,36	61	4,24	136,5	2,83	ND	ND	ND	ND
REP 2139-FL	48	7,1	138,5	10,6	46	0,4	142,5	7,8	ND	ND	ND	ND

El promedio y la desviación estándar se basaron en dos mediciones repetidas. ND=no determinado, *n=1

En cada caso, se observaron aumentos significativos en la polarización de fluorescencia con todos los ON en presencia de todos los cationes divalentes, lo que indica la formación de complejos de quelatos de ON con cationes metálicos divalentes. Estos resultados demuestran lo siguiente:

- 5 • Los ON forman dímeros y complejos de orden superior en presencia de calcio y magnesio. Se espera que estos complejos se formen con todos los demás cationes metálicos divalentes. La formación de estos complejos de ON implica la interacción de los ON con estos cationes metálicos divalentes.
- 10 • La formación de complejos de ON no se puede deber a la hibridación entre bases nitrogenadas a través de las interacciones tradicionales de Watson-Crick debido a la naturaleza degenerada de los ON probados. Además, REP 2031 (SEQ ID NO: 1), REP 2055 (SEQ ID NO: 2), REP 2057 (SEQ ID NO: 3) o REP 2139 (SEQ ID NO: 18) no se pueden autohibridar bajo las condiciones experimentales empleadas.
- 15 • La formación de complejos de ON es estable y soluble en disolución acuosa y ya que estos complejos parecen incorporar el metal divalente en cuestión como parte del complejo formado, estos complejos de ON tienen el efecto de quelar el metal divalente en cuestión de la disolución en la que el complejo de ON se formó.
- 20 • La quelación de estos metales y la formación del complejo de quelato de ON no es dependiente de una secuencia de nucleótidos particular, como se evidencia por la quelación observada con ON degenerados y también se produce con modificaciones de nucleótidos que incluyen la modificación del enlace fosfodiéster o el resto 2' ribosa o la modificación de la base (p. ej. 5' metilcitosina).
- La quelación de estos metales se produce con los ON en este ejemplo de 6-40 nucleótidos de longitud, lo que indica que los quelatos de ON se podrían formar con ON de cualquier longitud o mayores que 40 nucleótidos de longitud.

Ejemplo II

Formación de complejos de quelatos de ON con ON de doble cadena

25 Los ON de doble cadena se forman como se describe en el documento WO 2012/021985 a partir de dos ON complementarios de cadena sencilla que en disolución acuosa se hibridan entre sí a través de interacciones Watson-Crick. Ya que los ON de doble cadena todavía tienen una cadena principal de fosfodiéster expuesta en el exterior de la hélice de ADN formada, deberían ser capaces de formar complejos de quelato en presencia de cationes divalentes. Para probar esta hipótesis, se prepararon dos ON de ADN de doble cadena diferentes hibridando REP 2055-FL (40mer poli AC; SEQ ID NO: 2) con REP 2033-FL (40mer poli TG; SEQ ID NO: 6) y REP 2057-FL (40mer poli AG; SEQ ID NO: 3) con REP 2056-FL (40mer poli TC; SEQ ID NO: 5). Debido a que la hibridación de ON da como resultado un dúplex, el aumento resultante en la masa se puede detectar por un aumento en la polarización de fluorescencia en relación con los ON de cadena sencilla utilizados para preparar el complejo. Los ON de cadena sencilla (REP 2055-FL (SEQ ID NO: 2), Rep 2033-FL (SEQ ID NO: 6), Rep 2057-FL (SEQ ID NO: 3) y REP 2056-FL (SEQ ID NO: 5)) se diluyeron cada uno a 20 nM en tampón 1 x FP. La hibridación de los dos pares complementarios como se identifica anteriormente también se llevó a cabo en tampón 1 x FP (10 nM de cada ON) y la hibridación se confirmó por un aumento en la polarización de fluorescencia. Las construcciones de doble cadena se expusieron luego a CaCl₂ 100 mM o MgCl₂ 100 mM. La formación del complejo de quelato de ON se controló mediante un aumento adicional en la polarización de fluorescencia (véase la Tabla 4). Los resultados de este experimento confirman la hibridación exitosa de ambos pares complementarios de ON en ON de doble cadena como se evidencia por el aumento en la polarización de fluorescencia. Además, la adición de o CaCl₂ o MgCl₂ a estos ON de doble cadena dio como resultado un aumento adicional en la polarización de fluorescencia, lo que indica que estos ON de doble cadena también podrían formar complejos de quelatos en presencia de cationes metálicos divalentes. Estos resultados también sugieren fuertemente que los ON de doble cadena pueden formar complejos de quelatos de ON con cualquier catión divalente y también se espera que tengan el efecto de secuestrar los cationes divalentes de la disolución.

Tabla 4
Formación de complejos de quelatos con ON de cadena doble cadena

polarización de fluorescencia (mP)		calcio (como CaCl ₂)		
		desv. est.	promed.	
Metal no presente	REP 2056-FL + REP 2057-FL (dúplex)	desv. est.	5,9	
		promed.	189,0	
	REP 2055-FL + REP 2033-FL (dúplex)	desv. est.	10,4	
		promed.	167,0	
	magnesio (como MgCl ₂)			
	REP 2056-FL + REP 2057-FL (dúplex)	desv. est.	5,4	
		promed.	178,0	
	REP 2055-FL + REP 2033-FL (dúplex)	desv. est.	15,0	
		promed.	179,0	
	REP 2056-FL + REP 2056-FL (dúplex)	desv. est.	4,5	
		promed.	124,7	
	REP 2055-FL + REP 2033-FL (dúplex)	desv. est.	8,6	
	promed.	119,7		
REP 2056-FL (cadena sencilla)	desv. est.	7,4		
	promed.	74,3		
REP 2057-FL (cadena sencilla)	desv. est.	5,2		
	promed.	78,3		
REP 2033-FL (cadena sencilla)	desv. est.	5,2		
	promed.	65,7		
REP 2055-FL (cadena sencilla)	desv. est.	7,0		
	promed.	65,0		

El promedio y la desviación estándar se basaron en tres mediciones repetidas.

Ejemplo III

Actividad antiviral de los complejos de quelatos de ON en diversos virus con envoltura in vitro

Se llevaron a cabo experimentos para verificar la actividad antiviral de los complejos de quelatos de ON en tres virus con envoltura diferentes de diferentes familias virales: cepa MS (familia herpesviridae) del herpes simplex-2 (HSV-2), cepa Hong Kong (familia orthomyxoviridae) del influenza A (INFA) y cepa Long (familia paramyxoviridae) del virus sincitial respiratorio (RSV). Para cada virus, se comparó la eficacia de un ON con actividad antiviral conocida con su quelato de calcio in vitro midiendo la inhibición del efecto citopático viral de cada virus en sus células huésped. Para HSV-2 y RSV, se utilizaron células Vero y para INFA, se utilizaron células MDCK. Para las evaluaciones antivirales de HSV-2, se utilizó un ensayo de reducción de placa y para INFA y RSV, se utilizó un ensayo de efecto citopático (CPE).

Para el ensayo de reducción de placa, se sembraron células Vero a 75.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos utilizando medio de crecimiento Vero. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C y CO₂ al 5%. Al día siguiente, se aspiraron los medios y se añadieron aproximadamente 100 unidades formadoras de placa (pfu) de HSV en un volumen de 200 µL de medio de ensayo (medio de crecimiento Vero que contenía FBS al 2%). Se permitió que el virus se adsorbiera en las células durante 1 hora a 37°C y CO₂ al 5%. Se prepararon los compuestos diluyéndolos en medio de ensayo que contenía metilcelulosa al 0,5%. Después del período de incubación, se añadió 1 ml de cada dilución de fármaco para triplicar los pocillos de una placa (sin aspirar el inóculo del virus). Se incubaron las placas durante dos días para permitir la formación de la placa. Luego se aspiró el medio de los pocillos y las células se fijaron y se tiñeron utilizando metanol al 20% que contenía violeta cristal. Se enumeraron las placas mediante inspección microscópica y los datos se representaron como porcentaje del control del virus.

Para el ensayo de CPE, se mezclaron el virus y las células en presencia del compuesto de ensayo y se incubaron durante la duración del ensayo requerida (5 días para HSV-2 y 7 días para INFA y RSV). Cada virus se tituló previamente tal que los pocillos de control mostraron una pérdida de viabilidad celular del 85 al 95% debido a la replicación del virus. Por lo tanto, se observó efecto antiviral o citoprotección cuando los compuestos evitaron la replicación del virus. Se evaluaron las muestras para la eficacia antiviral con mediciones por triplicado utilizando 12 concentraciones preparadas por dilución en serie para determinar los valores de IC₅₀ y con mediciones duplicadas para determinar la citotoxicidad, si era detectable. Para los fines de este estudio, la concentración de FBS en cada ensayo fue de 0,5%. Al finalizar el ensayo, las placas de ensayo se tiñeron con el colorante soluble a base de tetrazolio MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) para determinar la viabilidad celular. El MTS es metabolizado por las enzimas mitocondriales de las células metabólicamente activas para producir un producto de formazán soluble, lo que permite el análisis cuantitativo rápido de la viabilidad celular y la citotoxicidad del compuesto. Este reactivo es una disolución estable y única que no requiere preparación antes de su uso. Al finalizar el ensayo, se añadieron 10-25 uL de reactivo MTS por pocillo (10% de concentración final basada en el volumen) y luego se incubaron las placas de microtitulación durante 4-6 horas a 37°C, CO₂ al 5% para evaluar la viabilidad celular. Se utilizaron selladores de placas adhesivas en lugar de las tapas, se invirtió la placa sellada varias veces para mezclar el producto de formazán soluble y se leyó la placa espectrofotométricamente a 490/650 nm con un lector de placas Molecular Devices Vmax o SpectraMax Plus. Los compuestos evaluados para la actividad antiviral incluyen, quelato de calcio REP 2055 y quelato de calcio REP 2139 (véase la Tabla 5). REP 2055 (un ON de ADN fosforotioato de 40mer con secuencia [AC]₂₀; SEQ ID NO: 2) y REP 2139 (un ON de ARN fosforotioato de 40mer con secuencia [2'OMeA-2'OMe, 5'MeC]₂₀; SED ID NO: 18) son NAP con actividad antiviral de amplio espectro contra virus con envoltura (Bernstein et al., 2008 *Antimicrobial Agents Chemother.*, 52: 2727-2733; Cardin et al., 2009, *Virology J.* 6: 214; Vaillant et al., 2006, *Antimicrobial Agents Chemother.*, 50: 1393-1401; Guzman et al., 2007, *Antiviral Therapy*, 12: 1147-1156; Lee et al., *Virology*, 372: 107-117; Matsumura et al., 2009, *Gastroenterology*, 137: 673-681 y las patentes de EE.UU. 8,008,269, 8,008,270 y 8,067,385) La única modificación del NAP requerida para la actividad antiviral es la fosforotioación de cada enlace en el ON. Las modificaciones adicionales, incluidas las modificaciones 2' ribosa (tal como la 2' O metilación) y las modificaciones de la base (tal como la 5' metilcitosina y/o el 4' tiouracilo) tienen un efecto insignificante sobre la actividad antiviral de los NAP, pero se pueden utilizar para optimizar la tolerabilidad en pacientes humanos. Se prepararon REP 2055 y REP 2139 como quelatos de calcio según la publicación de solicitud internacional n° WO 2012/021985 y la publicación de solicitud de EE.UU. n° 2012/0046348 con la proporción de 30 mg de CaCl₂ por cada 100 mg de ON.

Tabla 5

Actividad antiviral de los complejos de quelatos de ON in vitro

Ensayo del tipo de celular de la cepa de virus	Compuesto	IC ₅₀ (uM)
	REP 2055 quelato de calcio	1,91

Ensayo del tipo de celular de la cepa de virus	Compuesto	IC ₅₀ (uM)
Ensayo de placa de células Vero, cepa MS del HSV-2	REP 2139 quelato de calcio	0,445
Ensayo de CPE de células Vero, cepa Long del SRV	REP 2055 quelato de calcio	2,97
	REP 2139 quelato de calcio	2,05
Ensayo de CPE de células MCDK, cepa Hong Kong del influenza A	REP 2055 quelato de calcio	7,53

En los tres virus examinados se confirmó la actividad antiviral del quelato de calcio REP 2055 y el quelato de calcio REP 2139. Esto demuestra que los ON del NAP con actividad antiviral de amplio espectro contra HSV-2, RSV e INFA se pueden preparar como complejos quelados y aún muestran actividad antiviral en estos virus. Además, ya que la actividad antiviral de estos ON persistió con su administración como quelatos de ON, la administración de otras clases de ON (antisentido, ARNip, ARNmi, etc.) como quelatos de ON también es probable que no tengan un impacto significativo en la actividad biológica de estos ON. Esto se puede deber al hecho de que las interacciones específicas de las proteínas (en el caso de los NAP o aptámeros o los ON CpG) o interacciones de ácidos nucleicos (en el caso de antisentido, ARNip o ARNmi) son de una afinidad mucho mayor que la interacción del ON/catión metálico multivalente que ocurre en el complejo de quelato de ON. En combinación con las propiedades toxicológicas mejoradas de los quelatos de ON versus las sales de ON no queladas, estos experimentos sugieren que los ON antivirales que están quelados pueden ser fármacos antivirales más deseables que sus contrapartes no queladas. Además, se esperará que los quelatos de ON preparados a partir de polímeros basados en ácido nucleico tengan una actividad antiviral de amplio espectro contra virus con envoltura en general, como se describe en las patentes de EE.UU. 8,008,269, 8,008,270 y 8,067,385.

Ejemplo IV

Los quelatos de ON son agentes antivirales efectivos contra la infección crónica por el HBV en pacientes humanos.

Los pacientes con infección crónica por HBV preexistente se sometieron a una administración semanal de dosis molares comparables de REP 2055 preparadas como una disolución de sal de sodio simple según el estándar en la técnica como se describe anteriormente y REP 2139 preparado como un complejo de quelato de calcio (preparado con 30 mg de CaCl₂ por cada 100 mg de REP 2139 según la publicación de la solicitud internacional n° WO 2012/021985 y la publicación de solicitud de EE.UU. n° 2012/0046348) Los efectos antivirales de la administración de la sal de sodio del NAP (REP 2055) con el quelato de calcio del NAP (REP 2139-Ca), cuando se administra en dosis molares comparables utilizando regímenes de dosificación comparables se evaluaron mediante reducciones en los niveles de la proteína de antígeno de superficie del HBV (HBsAg) en la sangre (medido por la plataforma Abbott Architect™). Los efectos antivirales de REP 2055 y REP 2139-Ca se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

REP 2055 y REP 2139-Ca comparativamente eliminan HBsAg en suero en pacientes con infección crónica por el HBV

NAP	Paciente respondedor	Pretratamiento de HBsAg en suero (mIU/ml*)	HBsAg en suero en tratamiento (mIU/ml*)
REP 2055	1	934	0,25
	2	1885,4	0,38

NAP	Paciente respondedor	Pretratamiento de HBsAg en suero (mIU/ml*)	HBsAg en suero en tratamiento (mIU/ml*)
	3	384,1	0
	4	126645,07	0,03
	5	158180	0
	6	36996,00	7
	7	4762,5	43,7
REP 2139-Ca	1	70050	0,19
	2	13400	0
	3	3654,3	0,34
	4	47689,7	180,44
	5	107659,6	32,15
	6	58937,87	9,91
	7	17988,99	29,21
	8	125000	0,01
	9	1288,56	0,02

*según lo determinado por el ensayo cuantitativo Abbott Architect™ para HBsAg

- 5 Tanto REP 2055 como REP 2139-Ca son igualmente activos en el bloqueo de la liberación de las SVP de las células infectadas por el HBV a dosis molares comparables, que es el mecanismo de acción terapéuticamente relevante de todos los NAP contra la infección por el HBV en general. Esta actividad requiere específicamente el transporte intracelular de los NAP a los hepatocitos para lograr esta funcionalidad. Cuando se administraron REP 2055 y REP 2139-Ca, en regímenes de monoterapia comparables, se logró una reducción o eliminación de la HBsAg comparable en pacientes infectados por el HBV, lo que demuestra la actividad antiviral comparable de estos dos NAP diferentes y que la formulación de REP 2139 como complejo de quelato de calcio no tiene efecto discernible en su acumulación en el órgano, el transporte intracelular o la actividad bioquímica.
- 10 Estos resultados demuestran que los complejos de quelatos de ON, aunque tienen la capacidad de mejorar la tolerabilidad de los ON, probablemente bloqueando algunas interacciones de las proteínas, también se pueden desmontar de tal manera que no afecte a la acumulación de ON en el órgano (en el ejemplo anterior en el hígado) o al transporte intracelular (en el ejemplo anterior en los hepatocitos) que son esenciales para la actividad bioquímica de los NAP en particular y para muchos ON en general. La capacidad de los complejos de quelatos de ON para prevenir las interacciones de las proteínas implicadas en algunos aspectos de la tolerabilidad de ON (como se enseña en la publicación de solicitud de EE.UU. n° 2012/0046348) mientras que aún así da como resultado su acumulación en el órgano inalterada, el transporte intracelular y la actividad bioquímica no eran predecibles por un experto en la técnica a partir de las enseñanzas en la publicación de solicitud de EE.UU. n° 2012/0046348.
- 15
- 20 Estos resultados demuestran claramente la efectividad de un quelato de ON para el tratamiento de la infección crónica por el HBV. Otros ON activos contra el HBV o efectivos contra otras infecciones virales in vivo o en sujetos humanos se pueden preparar como quelatos de calcio y, con el beneficio de las descripciones presentadas en la presente memoria, se puede esperar de manera fiable que conserven su eficacia terapéutica al tiempo que mejoran la tolerabilidad durante la administración del compuesto o durante todo el régimen de tratamiento en conjunto. Habiendo descrito en la presente memoria el descubrimiento de que un complejo de quelato de ON no altera el efecto en
- 25 pacientes humanos del ON cuya actividad terapéutica requiere la retención de la acumulación específica en el órgano, la compartimentación intracelular y las interacciones bioquímicas también proporcionan una clara enseñanza de que

cualquier ON que se pueda formular como un complejo de quelato se puede utilizar para lograr su efecto terapéutico diseñado, independientemente de su mecanismo de acción, ya sea antisentido, ARNip, ARNmi, ARNhp o NAP, y tendrá el beneficio añadido de reducir los efectos secundarios relacionados con la administración, como se enseña en la publicación de solicitud de EE.UU. n° 2012/0046348.

5 Además, debido a que se ha demostrado que los NAP actúan contra el HBV bloqueando la liberación del antígeno de superficie del HBV, también serán activos contra el virus de la hepatitis D, un virus no relacionado que depende del antígeno de superficie del HBV para su producción. Como tal, también se espera que los complejos de quelatos de NAP sean activos contra la infección por el virus de la hepatitis delta.

10 De manera importante, el complejo de quelato de ON administrado a los pacientes en el ejemplo anterior mostró una clara mejora en los efectos secundarios relacionados con la administración: la infusión IV del quelato de calcio REP 2139 se pudo completar en dos horas y se acompañó de temblores leves o escalofríos solo en casos muy infrecuentes. Por el contrario, el REP 2055 administrado a pacientes humanos como una sal de sodio simple en una dosis molar comparable a REP 2139-Ca, requirió más de 10 horas para completar la infusión IV y casi siempre estuvo acompañado de fiebre moderada, escalofríos y temblores. Además, ha sido posible con el quelato de calcio REP 2139 administrar inyecciones subcutáneas diarias durante cinco semanas en pacientes humanos sin reacciones en el sitio de inyección, mientras que causa disminuciones en la HBsAg en suero. El uso de esta vía de administración sin la aparición de reacciones en el sitio de inyección no habría sido posible con la administración subcutánea de una sal de sodio de ON simple.

20 Estas observaciones demuestran que los complejos de quelatos de ON antivirales son un método útil para la administración de ON antivirales a un sujeto sin pérdida de actividad antiviral mientras mejoran enormemente los efectos secundarios relacionados con la administración.

Estas observaciones demuestran además que cualquier NAP u ON antisentido (incluidos los ON antisentido clásicos, ARNih, ARNmi o ARNhp) se puede formular como un complejo de quelato de ON sin interferir con el efecto biológico pretendido de los ON y además sin interferir con la biodistribución específica de los ON o el transporte intracelular.

25 **Ejemplo V**

Los NAP disminuyen los triglicéridos y el colesterol en suero in vivo

30 Para ver si los NAP podrían prevenir el inicio de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia en hámsters alimentados con una dieta alta en fructosa (HF), se administró REP 2031, un ácido oligodesoxicitídilico totalmente fosforotioado de 40mer (SEQ ID NO: 1) a los animales en una dieta HF mediante inyección intraperitoneal 3 veces a la semana durante 4 semanas. Se monitorearon varios parámetros relacionados con la hipercolesterolemia y la obesidad (véase la Tabla 9)

Tabla 9

Efectos de REP 2031 en hámsters alimentados con HF

Parámetro medido	Dieta normal de Chow	Dieta alta en fructosa	
	Solución salina normal	Solución salina normal	REP 2031 10mg/kg
Colesterol (mM)	3,54 ± 0,304	4,432 ± 0,341	3,82 ± 0,215
Triglicéridos (mEq/l)	2,295 ± 0,045	2,379 ± 0,050	2,286 ± 0,032

35 Estos resultados muestran que la administración de REP 2031 dio como resultado la inhibición de los aumentos en los triglicéridos y el colesterol asociados con una dieta de HF. Por lo tanto, los ON pueden tener una actividad terapéutica en la prevención de la hipercolesterolemia.

40 Se sometieron los pacientes humanos con hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia preexistente a una administración semanal de REP 2055 preparada como un complejo de quelato de calcio. Se monitorizaron los efectos de la administración de REP 2055 en el colesterol sérico total, LDL y triglicéridos utilizando procedimientos de laboratorio y metodologías de ensayo aceptados. Los efectos del tratamiento con REP 2055 en la dinámica del colesterol sérico se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Efecto del tratamiento con REP 2055 en la hiperlipidemia en pacientes humanos

Paciente	Colesterol total (mg/dL)		Colesterol LDL (mg/dL)		triglicéridos (mg/dL)	
	Pre	Tratam	Pre	Tratar	Pre	Tratam
1	200	160	95	69	155	83
2	261	135	190	76	130	69
3	243	171	163	107	185	117
4	122	110	40	55	215	104
5	120	118	61	71	93	40

5 LDL=lipoproteína de baja densidad, Pre=valor de referencia del pretratamiento, Tratamiento=nivel más bajo logrado en el tratamiento con REP 2055

10 En pacientes con colesterol y triglicéridos elevados (pacientes 1-3), el tratamiento con REP 2055 dio como resultado reducciones en el colesterol total y LDL, así como en los triglicéridos séricos. En pacientes con colesterol normal pero con triglicéridos leves a moderadamente elevados (pacientes 4 y 5), el tratamiento con REP 2055 no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de colesterol total y LDL, pero aun así dio como resultado una reducción en los triglicéridos séricos. Estos datos muestran que el NAP REP 2055 tiene la capacidad de reducir o normalizar el colesterol total y LDL, así como los triglicéridos.

15 En el ejemplo anterior, dos NAP diferentes (REP 2031 [SEQ ID NO: 1] y REP 2055 [SEQ ID NO: 2]), cada uno con una secuencia diferente pero que tienen las mismas propiedades fisicoquímicas fueron capaces de lograr efectos similares in vivo en la reducción de colesterol y triglicéridos séricos. Estos resultados demuestran claramente la actividad independiente de la secuencia de los NAP en la reducción del colesterol y triglicéridos séricos y muestran que se espera que cualesquiera de los NAP descritos en la presente memoria tengan un efecto similar a REP 2013 y REP 2055 mostrado en la presente memoria.

20 Debido a que la actividad antiviral, las actividades anti-triglicéridos, anti-colesterol y anti-priones de los NAP se derivan de las mismas propiedades independientes de la secuencia de los oligonucleótidos fosforotioados, la descripción actual de la retención de la actividad antiviral de los NAP cuando se formula como complejos de quelatos contra una infección viral proporciona una prueba definitiva de que los NAP también conservarán sus actividades anti-triglicéridos, anti-colesterol y anti-priones, también cuando se administran como complejos de quelatos de ON.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> REPLICOR INC.
- 5 <120> MÉTODOS DE COMPLEJOS DE QUELATOS DE OLIGONUCLEÓTIDOS
 <130> 05016051-36PCT
- <150> US 61/648694
 <151> 18-05-2012
- 10 <160> 20
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
 15 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 20 <223> REP 2031, completamente fosforotioado
- <400> 1
 ccccccccc ccccccccc ccccccccc ccccccccc 40
- <210> 2
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> REP 2055, completamente fosforotioado
- <400> 2
 35 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 40
- <210> 3
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
 <223> REP 2057, completamente fosforotioado
- <400> 3
 45 agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 40
- <210> 4
 <211> 40
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
 <223> fosforotioado completo, 2' O metilribosa completa, cada citosina 5' metilada
- <400> 4
 55 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 40
- <210> 5
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
 <223> REP 2056, completamente fosforotioado

- <400> 5
tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc 40
- 5 <210> 6
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> REP 2133, completamente fosforotioado
- <400> 6
tgtgtgtg tgtgtgtg tgtgtgtg tgtgtgtg 40
- 15 <210> 7
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> ARNmi, LNA/ADN, completamente fosforotioado
- <220>
- 25 <221> característica miscelánea
<222> 3, 6, 9, 12, 15
<223> LNA
- <220>
- 30 <221> base modificada
<222> 12, 15
<223> m5c
- <400> 7
ccattgtcac actcca 16
- <210> 8
<211> 22
<212> ADN
- 40 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> ARNsi
- 45 <220>
<221> característica miscelánea
<222> 20, 21
<223> desoxitimidina
- 50 <220>
<221> característica miscelánea
<222> 1-18
<223> ribonucleótido
- <400> 8
ggcuccuuag caaagucaag tt 22
- <210> 9
<211> 21
<212> ADN
- 60 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> ARNsi
- 65 <220>

- <221> característica miscelánea
 <222> 19, 20
 <223> desoxitimidina
- 5 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> 1-18
 <223> ribonucleótido
- 10 <400> 9
 cuugacuuug cuaagagcct t 21
- <210> 10
 <211> 40
- 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> fosforotioato completo
- 20 <400> 10
 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 40
- <210> 11
 <211> 40
- 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> REP 2148, fosforotioato completo, C = 5' metilcitudina
- 30 <400> 11
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 40
- <210> 12
 <211> 40
- 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> fosforotioato completo, C = 5' metilcitudina
- <400> 12
 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 40
- 45 <210> 13
 <211> 40
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
 <223> fosforotioato completo, 2' O metil ribosa completa
- <400> 13
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 40
- <210> 14
 <211> 40
- 60 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> fosforotioato completo, 2' O metilribosa completa
- 65 <400> 14
 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 40

- 5 <210> 15
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> fosforotioato completo
- 10 <400> 15
 gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga 40
- <210> 16
 <211> 40
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> fosforotioato completo
- 20 <400> 16
 ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct 40
- <210> 17
 <211> 40
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> fosforotioato completo
- 30 <400> 17
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 40
- <210> 18
 <211> 40
 35 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> REP 2139, fosforotioato completo, 2' O metil ribosa completa, C = 5' metilcitolina
- <400> 18
 45 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 40
- <210> 19
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
 <223> antisentido, fosforotioato completo, 2' O metil ribosa completa
- <400> 19
 55 ucaaggaaga uggcauuucu 20
- <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> fosforotioato completo
- 65 <220>
 <221> característica miscelánea

ES 2 767 333 T3

<222> 1-5, 16-20
<223> 2'MOE ARN

<220>
5 <221> base modificada
<222> 12, 15
<223> m5c

10 <400> 20
gcctcagtct gcttcgacc 20

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende un complejo de quelato de oligonucleótido anti-viral preparado con un catión metálico divalente para uso en un método para tratar una infección viral.
- 5 2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho complejo de quelato de oligonucleótido se prepara con al menos uno de calcio, magnesio, hierro (2+), manganeso, cobre o zinc.
3. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2 para el uso según la reivindicación 1, en donde el quelato de oligonucleótido se prepara con calcio, magnesio o calcio y magnesio.
- 10 4. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos un oligonucleótido con al menos un enlace fosforotioato.
5. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos un oligonucleótido con una ribosa 2' modificada.
- 15 6. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos un oligonucleótido que tiene cada ribosa 2' O-metilada.
7. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos un oligonucleótido que tiene al menos una 5' metilcitosina.
- 20 8. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos un oligonucleótido seleccionado de las SEQ ID NOs: 1-6 y 10-18.
9. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho complejo de quelato de oligonucleótido comprende al menos uno de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 11.
- 25 10. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho complejo de quelato de oligonucleótido comprende el oligonucleótido SEQ ID NO: 18 (REP2139).
11. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho complejo de quelato de oligonucleótido está formulado para una administración subcutánea o una infusión intravenosa.
- 30 12. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en donde el virus que causa la infección es el virus de la hepatitis B.
13. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en donde el método para tratar una infección viral es reducir la HBsAg en un paciente con infección crónica por el HBV y en donde el complejo de quelato de oligonucleótido comprende la SEQ ID NO: 18 (REP 2139) formulada como un complejo de quelato de calcio.
- 35 14. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en donde el virus que causa la infección es al menos uno de los hepadnavirus y el virus de la hepatitis delta.
15. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en donde el virus que causa la infección es influenza.
- 40 16. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en donde el virus que causa la infección se selecciona del grupo que consiste en: un miembro de los retroviridae, HIV-1, HIV-2, un miembro de los herpesviridae, HSV-1, HSV-2, citomegalovirus, un miembro de los poxviridae, un miembro de los paramyxoviridae, virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza, un miembro de los bunyaviridae, hantavirus, un miembro de los filoviridae, virus de Ébola, virus de Marburg, un miembro de los flaviviridae, el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus del Nilo Occidental, el virus de la hepatitis C, un miembro de los ortomixoviridae, un miembro de los togaviridae, un miembro de los coronavirusidae, un miembro de los rahadoviridae y un miembro de los arenaviridae.
- 45

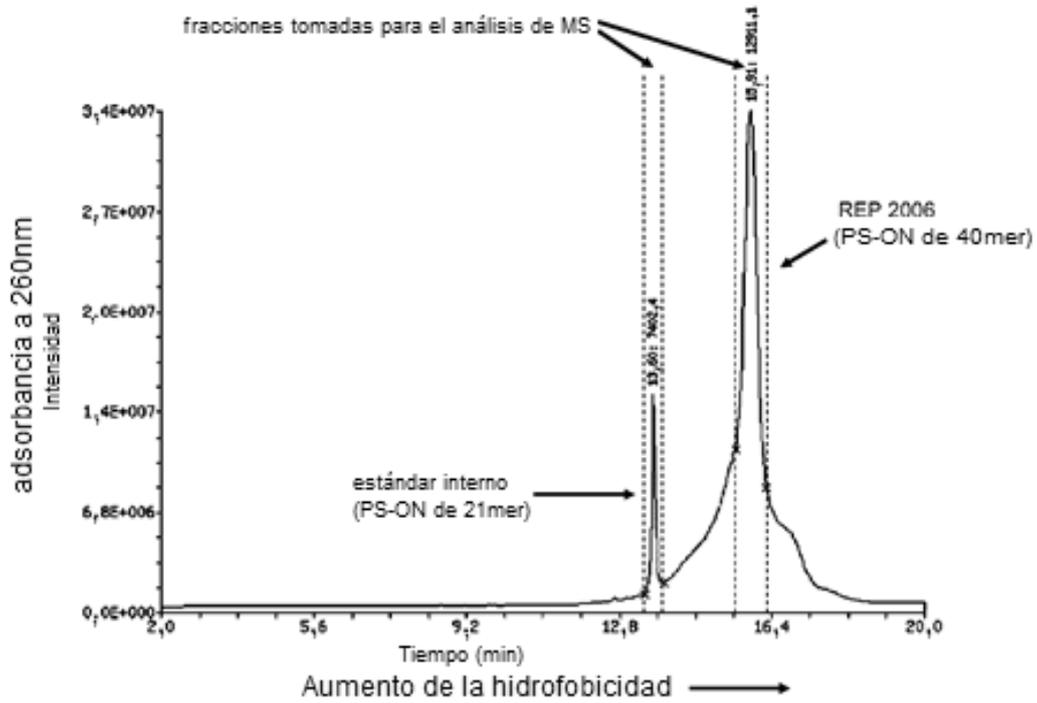


Fig. 1A

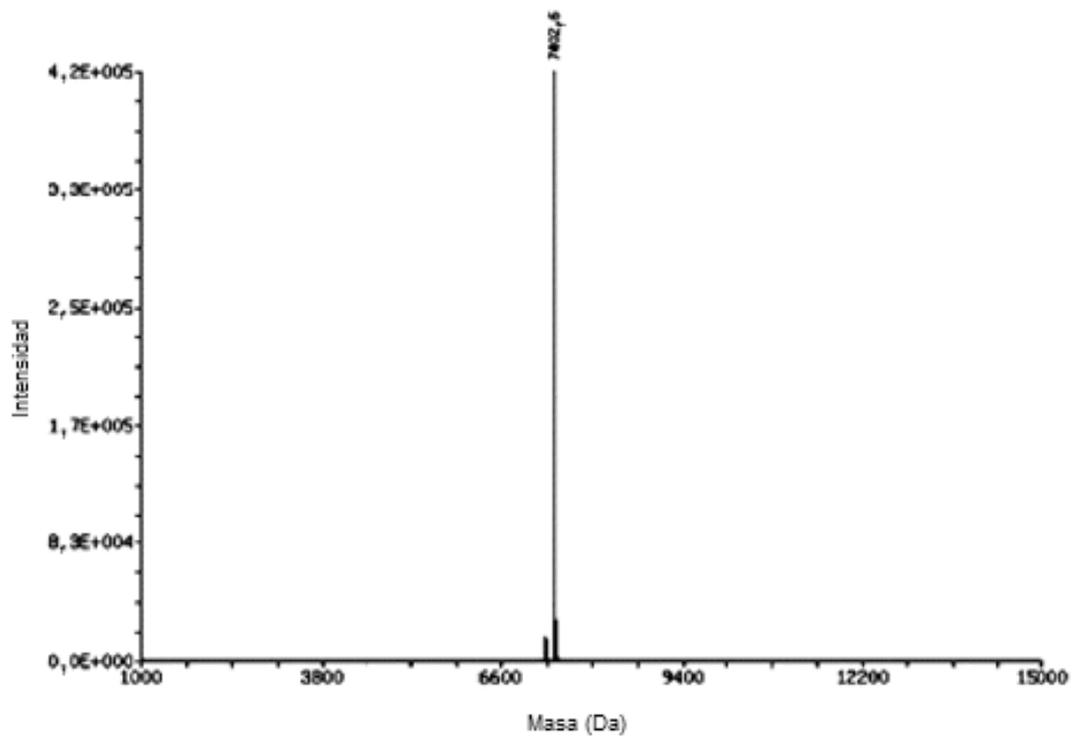


Fig. 1B

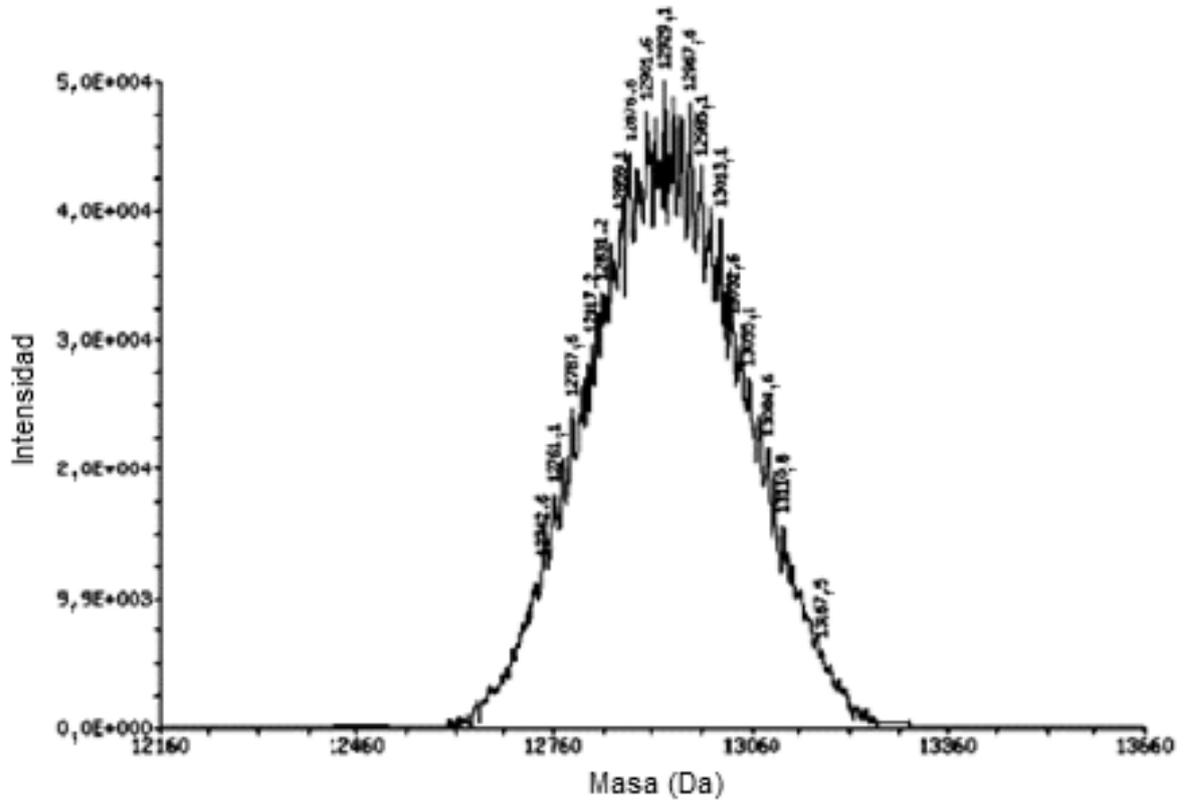


Fig. 1C

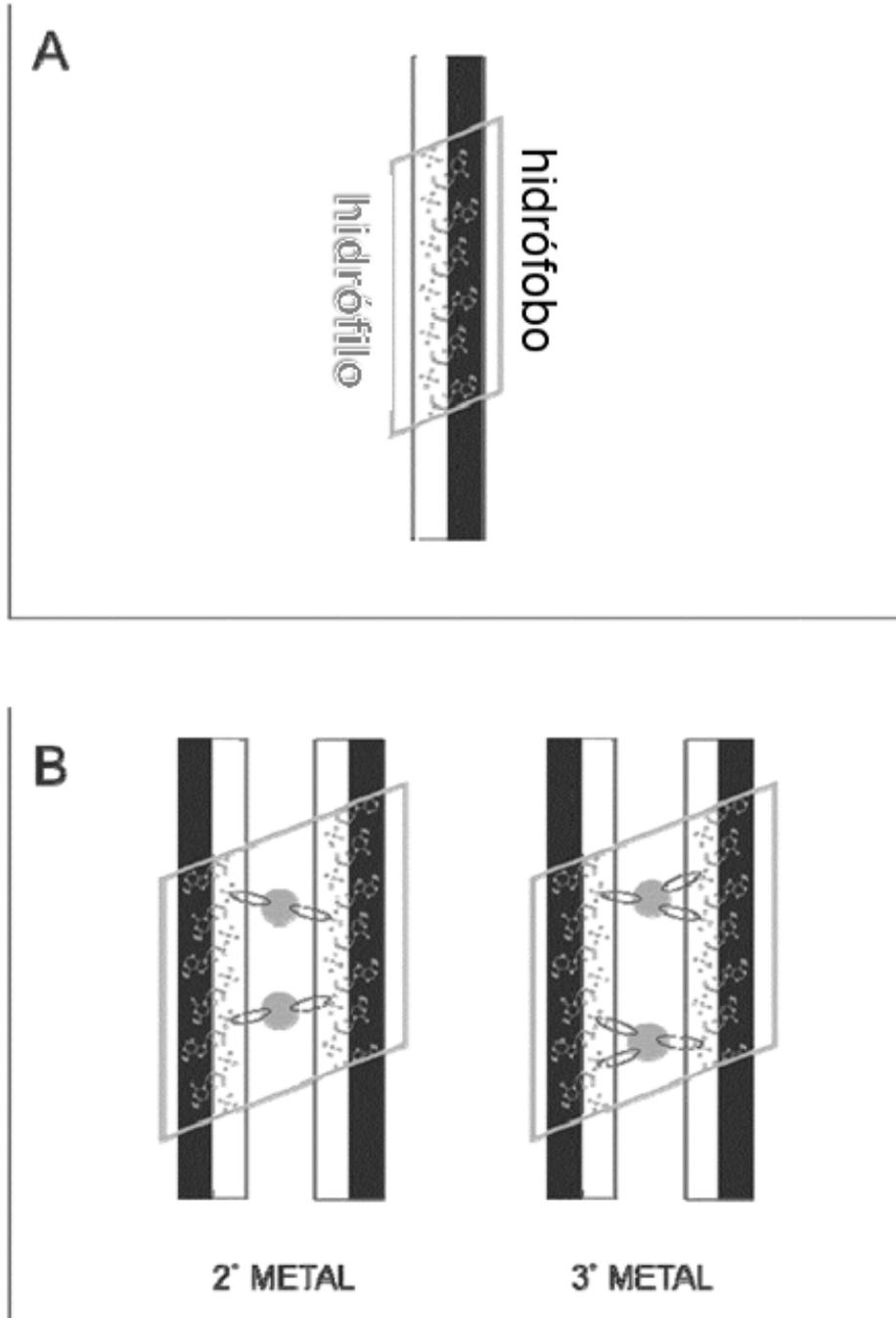


Fig. 2

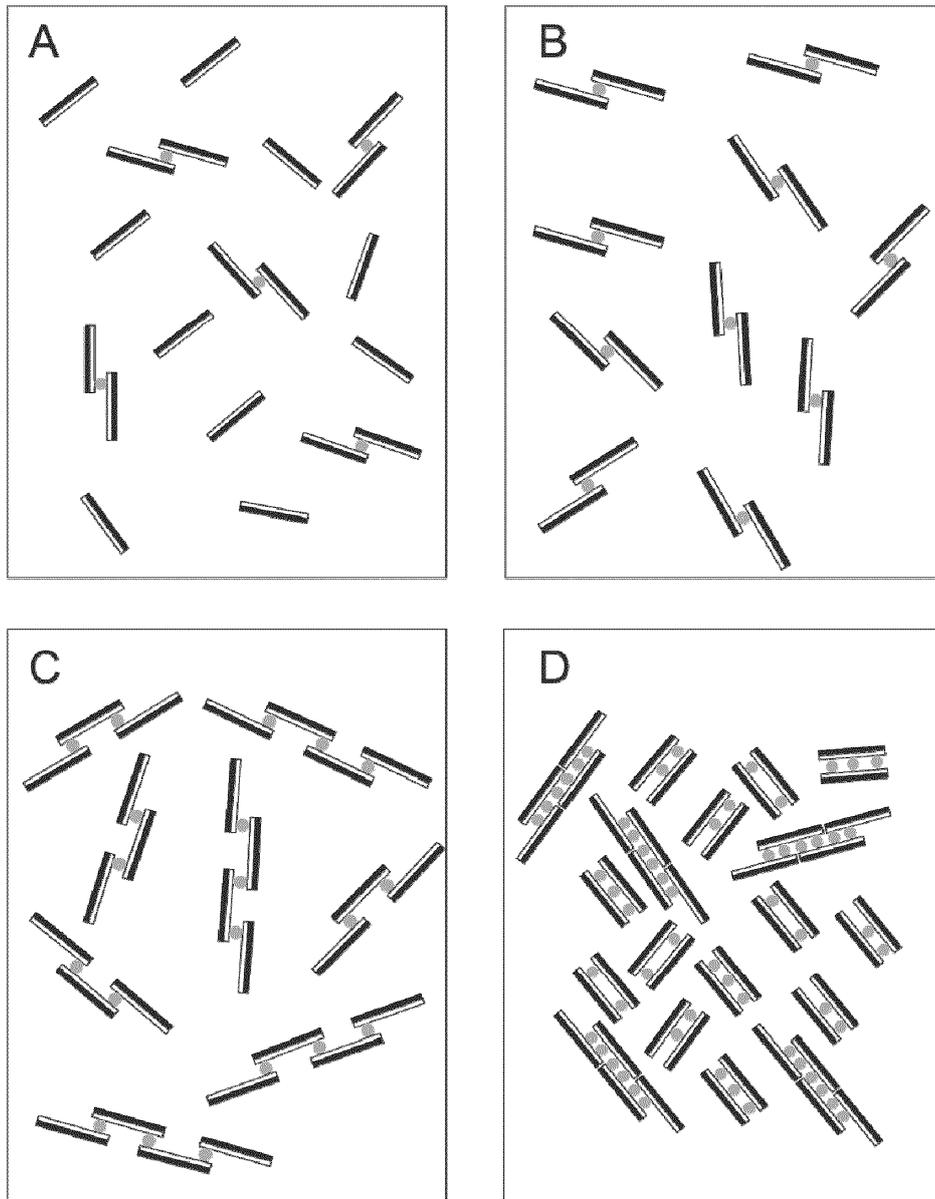


Fig. 3

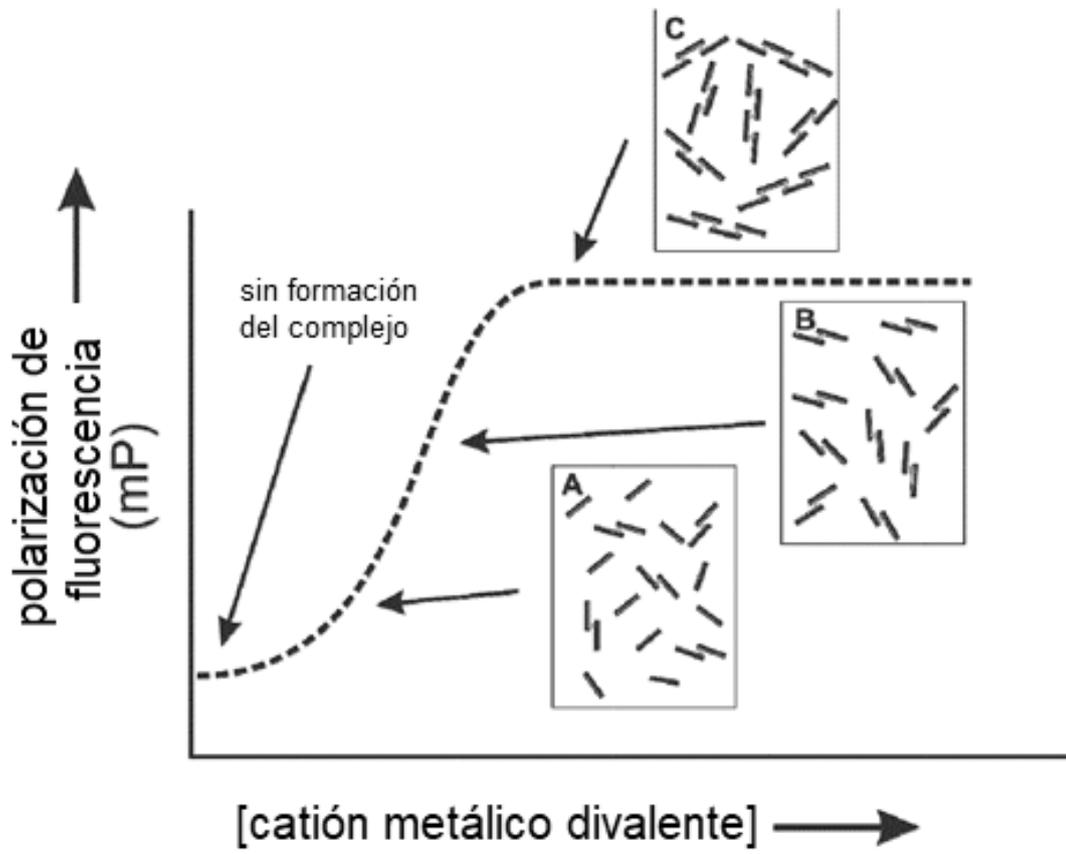


Fig. 4