

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 786 007**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/115** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2013 PCT/EP2013/000056**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13104540**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2013 E 13700617 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2802660**

---

(54) Título: **Nuevos ácidos nucleicos de unión a C5a**

(30) Prioridad:

**10.01.2012 EP 12000106  
10.01.2012 WO PCT/EP2012/000089  
08.10.2012 EP 12006960**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.10.2020**

(73) Titular/es:

**APTARION BIOTECH AG (100.0%)  
Max-Dohrn-Strasse 8-10  
10589 Berlin, DE**

(72) Inventor/es:

**HÖHLIG, KAI;  
VATER, AXEL;  
BUCHNER, KLAUS;  
MAASCH, CHRISTIAN y  
KLUSSMANN, SVEN**

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 786 007 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

## Nuevos ácidos nucleicos de unión a C5a

La presente invención se refiere a una molécula de ácido L-nucleico con la capacidad de unirse a C5a humana y C5a de ratón, a la molécula de ácido L-nucleico para uso en un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, a una composición farmacéutica que comprende la molécula del ácido L-nucleico, al uso de la molécula del ácido L-nucleico para la fabricación de un medicamento, al uso de la molécula del ácido L-nucleico para la fabricación de un medio de diagnóstico, a un complejo que comprende la molécula del ácido L-nucleico, al uso de la moléculas del ácido L-nucleico para la detección de C5a, a un método para el cribado de un antagonista de una actividad mediada por C5a que comprende utilizar la molécula del ácido L-nucleico, a un kit que comprende la molécula del ácido L-nucleico y un método para la detección de la molécula del ácido L-nucleico.

La estructura principal de la anafilatoxina C5a humana (factor de complemento 5a; SwissProt entry P01031); se determinó en 1978 (Fernandez & Hughli 1978). Consiste en 74 aminoácidos que tienen un peso molecular de 8.200 Da, en tanto que la parte de carbohidratos tiene aproximadamente 3.000 Da. La parte de carbohidratos de C5a existe como una sola unidad de oligosacárido compleja unida a una asparagina en la posición 64. Los tres enlaces disulfuro confieren a la molécula una estructura rígida y estable.

Aunque generalmente se ha mantenido la estructura tridimensional de las formas de C5a de diferentes especies de mamífero, la secuencia de aminoácidos no ha sido particularmente bien conservada durante la evolución. La alineación de secuencias demuestra el 64% de identidad de secuencia general de C5a humana y de ratón. La C5a humana comparte los siguientes porcentajes de aminoácidos idénticos con C5a de:

• Macaca mulatta (mono rhesus)	85%
• Macaca fascicularis mono cinomolgo)	85%
• Bos taurus (bovino)	69%
• Sus scrofa (cerdo)	68%
• Mus musculus (ratón)	64%
• Ratus norvegicus (rata)	61%

Además de la homología de secuencias limitada, la glicosilación es también heterogénea. Aunque C5a humana está glicosilada en la asparagina 64, la homóloga de murido no está en absoluto glicosilada. Las proteínas humanas C3a y C4a más distintamente relacionadas, comparten únicamente el 35 y 40%, respectivamente, de identidad con C5a.

Al comienzo del último siglo se descubrió el sistema del complemento, como una fracción de suero sensible al calor que “complementaba” la lisis de células y bacterias mediada por antisueros. Siendo un componente humorar de la respuesta inmunitaria no específica natural (innata), desempeña un papel esencial en la defensa del hospedante contra agentes infecciosos y en el proceso inflamatorio. El complemento puede ser activado por tres vías distintas: (i) después de que un anticuerpo se une por sí mismo a una superficie celular o bacteria (denominada vía clásica), (ii) directamente por glicolípidos bacterianos o virales (denominada vía alternativa), o (iii) por carbohidratos sobre bacterias (denominada vía de lectina). Todas estas vías de activación convergen en el punto de activación de los componentes del complemento C3 y C5, en donde se inicia la vía terminal común, culminando en un ensamblaje del complejo de ataque a membranas (abreviadamente MAC). El sistema del complemento consiste en más de 20 proteínas solubles que funcionan ya sea como enzimas proteolíticas o como proteínas de unión y que constituyen aproximadamente el 10% de las globulinas totales en el suero de vertebrado. Además, el sistema del complemento incluye múltiples receptores distintos de la superficie celular que exhiben especificidad para fragmentos proteolíticos de proteínas del complemento y que son expresados por células inflamatorias y células que regulan la respuesta inmunitaria adaptable. Existen varias proteínas reguladoras que inhiben la activación del complemento y por lo tanto protegen a las células hospedantes del ataque accidental del complemento. El sistema del complemento puede llegar a activarse independientemente o junto con la respuesta inmunitaria adaptable.

Las funciones del complemento incluyen el proceso de opsonización (es decir, hacer las bacterias más susceptibles a fagocitosis), lisis de bacterias y células extrañas insertando un poro en su membrana (denominado complejo de ataque de membranas), generación de sustancias quimiotácticamente activas, incremento de la permeabilidad vascular, evocación de la contracción de la musculatura lisa y promoción de la desgranulación de mastocitos. De forma similar a la cascada de coagulación, el proceso de activación del complemento se organiza en etapas enzimáticas secuenciales también conocidas como cascada enzimática (Sim and Laich, 2000). La secuencia detallada de estas interacciones se describe a continuación.

*Vía clásica.* Esta vía de activación dependiente de anticuerpos complementa la respuesta específica de anticuerpos. Es controlada de forma tan elaborada como la vía alternativa, pero carece de la capacidad de iniciación espontánea, es decir, la función de reconocimiento independiente de anticuerpos, y el mecanismo de amplificación de retroalimentación. Entre los activadores de la vía clásica se encuentran complejos antígeno-anticuerpo,  $\beta$ -amiloide, DNA, ácido poliinosínico, complejos polianión-policatión como heparina/protamina, algunos virus envueltos, cristales

de urato monosódico, lípido A de paredes de células bacterianas, ácido plicátiico, polisacárido de veneno de hormiga, membranas subcelulares (tales como de mitocondrias) así como enzimas derivadas de células y plasma, tales como plasmina, calicreína, factor de Hageman activado, elastasa o catepsinas. La vía clásica inducida por anticuerpos se inicia con C1, que se une al fragmento Fc de un anticuerpo ( $IgM > IgG3 > IgG1 >> IgG2$ ) ligado a un antígeno de la superficie celular. C1 es un complejo de reconocimiento compuesto de 22 cadenas de polipéptido en 3 subunidades; C1q, C1r, C1s. El C1q es el resto de reconocimiento real, una glicoproteína que contiene un dominio de tipo colágeno (que exhibe residuos de hidroxiprolina e hidroxilisina) que parece un manojo de tulipanes. En el momento de la unión por C1q, el C1r es activado para convertirse en una proteasa que escinde C1s hasta una forma que activa por escisión tanto C2 como C4, a C2a/b y C4a/b. C2a y C4b se combinan para producir C4b2a, la C3 convertasa (enzima activadora de C3). El C4a tiene únicamente una actividad de anafilatoxina débil, pero no es quimiotáctico. C3 es central para las tres vías de activación. En la vía clásica, la C4b2a convertasa escinde C3 en C3a/b. C3a es una anafilatoxina. C3b se combina con C4b2a para formar el complejo C4b2a3b (C5 convertasa). C3b también puede unir directamente a células haciéndolas sensibles a la fagocitosis (opsonización).

**Vía alternativa.** Esta vía no requiere anticuerpos para activación, y es de mayor importancia en la defensa del hospedante contra infecciones bacterianas y virales, debido – a diferencia de la vía clásica – a que es activada directamente por estructuras de la superficie de los microorganismos invasores, tal como glicolípidos y endotoxinas bacterianas/virales. Otros activadores son inulinas, eritrocitos de conejo, eritrocitos humanos desialilados, factor de veneno de cobra u oligonucleótidos de fosforotioato. Las seis proteínas C3, Factores B, D, H, I, y properdina juntas desempeñan las funciones de iniciación, reconocimiento y activación de la vía lo cual da como resultado la formación de la C3/C5 convertasa unida al activador. La cascada comienza con C3. Siempre se encuentra una pequeña cantidad de C3b en la circulación como resultado de la escisión espontánea de C3 ("C3-tickover"), aunque las concentraciones se mantienen generalmente muy bajas por degradación subsecuente. Sin embargo, cuando C3b se une a azúcares en la superficie celular, puede servir como un núcleo para la activación de la vía alternativa. Posteriormente el Factor B se une a C3b. En la presencia de Factor D, el Factor B unido es escindido en Ba y Bb; Bb contiene el sitio activo para una C3 convertasa. Posteriormente, la properdina se une a C3bBb para estabilizar la C3bBb convertasa en la superficie celular lo que conduce a la escisión de más moléculas C3. Finalmente se forma la C5 convertasa alternativa C3bBb3b que escinde C5 en C5a/b. Una vez presente, C5b inicia el ensamblaje del complejo de ataque a membranas tal como se describió anteriormente. Generalmente, únicamente las células Gram-negativas pueden ser lisadas directamente por el anticuerpo más el complemento; las células Gram-positiva son en su mayoría resistentes. Sin embargo, la fagocitosis es altamente potenciada por opsonización con C3b (fagocitos que tienen receptores C3b en su superficie) y el anticuerpo no siempre es requerido. Además, el complemento puede neutralizar partículas de virus ya sea mediante lisis directa o evitando la penetración viral de las células hospedantes.

**Vía de las lectinas.** La vía de las lectinas o de lectinas de unión a manano (abreviadamente MBL) la más recientemente descubierta, depende del reconocimiento innato de las sustancias extrañas (es decir, superficies bacterianas). Esta vía tiene similitudes estructurales y funcionales con la vía clásica. La activación de la vía de lectina es iniciada por la proteína MBL en fase aguda, la cual reconoce manosa en bacterias, IgA y probablemente estructuras expuestas por el endotelio dañado. La MBL es homóloga a la C1q y activa las serina-proteasas asociadas a MBL (abreviadamente MASP), de las cuales se han descrito las tres formas, MASP1, MASP2 y MASP3. La activación de la vía de lectina adicional es virtualmente idéntica a la activación de la vía clásica formando las mismas C3 y C5 convertasas. Además, existe cierta evidencia de que las MASP, bajo ciertas condiciones, pueden activar directamente C3.

**Vía terminal.** Las tres vías de activación convergen en la formación de la C5 convertasa (C4b2a3b en la vía clásica y de lectina, C3bBb3b en la vía alternativa), la cual escinde C5 en C5a/b. C5a tiene actividad de anafilatoxina potente y es quimiotáctica. El otro fragmento de C5, C5b, funciona con su sitio de unión hidrófobo como un ancla en la superficie de la célula diana para la cual forma el complejo de ataque a membrana lítico (MAC o complejo de complemento terminal, abreviadamente TCC). El MAC se ensambla a partir de cinco proteínas precursoras: C5b, C6, C7, C8 y C9. El evento final es la formación de oligómeros C9, que se insertan por sí mismos como canales transmembranales en la membrana de plasma que conduce a la lisis osmótica de la célula. El ensamblaje de MAC es controlado por factores solubles del plasma, la proteína S (también conocida como vitronectrina) y SP-40,40 (también conocida como clusterina), y por CD59 y HRF (factor de restricción homólogo) en membranas de la célula hospedante. Muchos tipos de células son sensibles a lisis mediadas por el complemento: eritrocitos, plaquetas, bacterias, virus que poseen una envoltura de lipoproteína y linfocitos.

El sistema del complemento es un mecanismo potente para iniciar y amplificar la inflamación. Esta está mediada por fragmentos de los componentes del complemento. Las anafilatoxinas son los mejores fragmentos definidos y son fragmentos proteolíticos de las serina-proteasas del sistema del complemento: C3a, C4a y C5a. Las anafilatoxinas no solo se producen durante el curso de la activación del complemento, sino también a partir de la activación de otros sistemas de enzimas que pueden escindir directamente C3, C4 y C5. Dichas enzimas incluyen trombina, plasmina, calicreína, enzimas lisosomales de tejidos y leucocitos y proteasas bacterianas. Las anafilatoxinas tienen efectos poderosos sobre las paredes de vasos sanguíneos, originando la contracción de la musculatura lisa (por ejemplo, músculo ílico, bronquial, uterino y vascular) y un incremento de la permeabilidad vascular. Estos efectos muestran taquifilaxis específica (es decir estimulación repetida que induce la disminución de respuesta) y puede ser bloqueada por antihistaminas; probablemente mediados indirectamente por liberación de histamina de mastocitos y

basófilos. C5a es el producto de escisión N-terminal de 74 aminoácidos de la cadena  $\alpha$  de la proteína plasmática C5. Está unida por el receptor C5aR (también conocido como C5R1 o CD88) con alta afinidad, una molécula presente en muchos tipos de células diferentes: más prominentemente neutrófilos, macrófagos, células de la musculatura lisa y células endoteliales. C5a es con mucho la anafilatoxina más potente, aproximadamente 100 veces más eficaz que 5 C3a, y 1000 veces más eficaz que C4a. Esta actividad disminuye en el orden de C5a > histamina > acetilcolina > C3a >> C4a.

C5a es extremadamente potente en la estimulación de quimiotaxis, adherencia, generación de estallido respiratorio, y desgranulación de neutrófilos. C5a también estimula los neutrófilos y células endoteliales para presentar más moléculas de adhesión. La inyección intravenosa de C5a, por ejemplo, conduce rápidamente a neutropenia en 10 experimentos con animales, por la activación de la adherencia de neutrófilos a las paredes de vasos sanguíneos. El ligamiento del receptor de C5a de neutrófilos va seguido por la movilización de ácido araquidónico membranal que se metaboliza a prostaglandinas y leucotrienos incluyendo LTB4, otro quimioatrayente potente para neutrófilos y monocitos. Después del ligamiento de los receptores de C5a de monocitos, se libera IL-1. Por lo tanto, la liberación 15 local de C5a en sitios de inflamación da como resultado estímulos proinflamatorios poderosos. De hecho, la liberación de C5a está conectada directa o indirectamente con muchos estados agudos o crónicos, tal como enfermedades asociadas al complejo inmunitario en general (Heller et al., 1999); asma (Kohl, 2001); choque séptico (Huber-Lang et al., 2001); síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (abreviadamente SIRS); insuficiencia de múltiples órganos (abreviadamente MOF); síndrome de dificultad respiratoria aguda (abreviadamente ARDS); 20 síndrome intestinal inflamatorio (abreviadamente IBD) (Woodruff et al., 2003); infecciones; quemaduras severas (Piccolo et al., 1999); lesión por reperfusión de órganos tal como corazón (van der Pals et al. 2010), bazo, vejiga, páncreas, estómago, pulmón, hígado, riñón, extremidades, cerebro, músculo esquelético o intestino (Riley et al., 2000); psoriasis (Bergh et al., 1993); miocarditis; esclerosis múltiple (Muller-Ladner et al., 1996); y artritis reumatoide (abreviadamente RA) (Woodruff et al., 2002).

Se han publicado numerosas revisiones generales con respecto a la relación entre el sistema del complemento y 25 enfermedades (Kirschtink, 1997; Kohl, 2001; Makrides, 1998; Walport, 2001a; Walport, 2001b).

La lesión celular por el complemento ocurre como una consecuencia de activación ya sea de la vía clásica o la alternativa en la superficie de una célula. El MAC constituye una organización supramolecular que está compuesta de aproximadamente veinte moléculas de proteína y que representa un peso molecular de aproximadamente 1,7 millones de Da. El MAC completamente ensamblado contiene una molécula de cada uno de C5b, C6, C7 y C8 y 30 varias moléculas de C9. Todos sus componentes MAC son glicoproteínas. Cuando C5 es escindido por la C5 convertasa y se produce C5b, comienza el autoensamblaje de MAC. C5b y C6 forman un complejo bimolecular estable y soluble que se une a C7 y lo induce a expresar un sitio metaestable a través del cual el complejo trimolecular naciente (C5b-7) se puede insertar por sí mismo en membranas, cuando ocurre en una bicapa lípídica diana o en su proximidad. La inserción es mediada por regiones hidrófobas en el complejo C5b-7 que aparece 35 después de la unión de C7 a C5b-6. C5b-7 unido a membrana presenta el ensamblaje MAC a un sitio de membrana y forma el receptor para C8. La unión de una molécula C8 a cada complejo C5b-7 origina pequeños canales transmembranales con un diámetro funcional menor que 1 nm que pueden perturbar las membranas de eritrocito y bacterianas dianas. Cada complejo C5b-8 unido a membrana actúa como un receptor para múltiples moléculas C9 y parece facilitar la inserción de C9 en el núcleo hidrocarbonado de la membrana celular. La unión de una molécula de 40 C9 inicia un proceso de oligomerización de C9 en el sitio de ataque a la membrana. Despues de que al menos 12 moléculas se incorporen en el complejo, se forma una estructura de canal separada. Por consiguiente, el producto final consiste en el complejo C5b-8 tetramolecular (con un peso molecular de aproximadamente 550 kDa) y poli-C9 tubular (con un peso molecular de aproximadamente 1.100 kDa). Esta forma de MAC, una vez insertada en las 45 membranas celulares, crea canales transmembranales completos que conducen a la lisis osmótica de la célula. Los canales transmembranales formados varían en tamaño dependiendo del número de moléculas C9 incorporadas en la estructura de canal. Mientras que la presencia de poli-C9 no es absolutamente esencial para la lisis de glóbulos rojos o de células nucleadas, puede ser necesario para matar las bacterias.

El sistema del complemento es principalmente beneficioso en la defensa del cuerpo contra microorganismos invasores. Los componentes tempranos de la cascada de complemento son importantes para la opsonización de 50 agentes infecciosos seguido de su eliminación del cuerpo. Además, existen diversas funciones normales del sistema inmunitario, como controlar la formación y eliminación de complejos inmunitarios o la limpieza de residuos, tejidos muertos y sustancias extrañas. Las tres vías de activación que reconocen diferentes patrones moleculares (en el cuerpo saludable) definen una formación extensa de estructuras no autónomas que ayudan a controlar a los invasores. La vía de complemento terminal – que culmina en el ensamblaje de MAC – representa una línea adicional 55 de defensa por lisis de bacterias y células extrañas.

La importancia de un sistema del complemento funcional queda clara cuando se consideran los efectos de las deficiencias del complemento. Por ejemplo, los individuos que carecen de una de las proteínas de la vía alternativa o componentes tardíos (C3-C9) tienden a tener infecciones severas con organismos piogénicos, particularmente especies de *Neisseria*. Las deficiencias en los componentes de la vía clásica (tal como C1, C2, C4) también están 60 asociadas con riesgo de infección incrementado, aunque no tan fuertemente elevado. Los componentes del complemento como C1 y MBL, tienen también la capacidad de neutralizar virus interfiriendo la interacción viral con la membrana de células hospedantes, evitando de esta forma la entrada en la célula.

Se debe observar, que, aunque la escisión de C5 conduce a C5a, así como al MAC, las características clínicas de las deficiencias de C5 no difieren marcadamente de las de otras deficiencias de componentes terminales (por ejemplo, C6, C7, C8, C9) lo que sugiere que la ausencia de C5a no contribuye significativamente a la imagen clínica en pacientes con deficiencia de C5. Por consiguiente, la antagonizarán selectiva de C5a promete ser la solución óptima, de modo que permanecen intactas las funciones normales anteriores y posteriores del complemento que previenen las enfermedades. Por lo tanto, únicamente se bloquea la sobreproducción perjudicial de la anafilatoxina proinflamatoria.

El hecho de que ratones deficientes en C5aR – aunque son más susceptibles a infecciones con *Pseudomonas aeruginosa* – por otra parte parecen ser normales, sugiere que el bloqueo de la función de C5a no tiene efectos perjudiciales.

Se conocen diversos compuestos que se dirigen a C5a o C5 o al receptor respectivo y fueron probados exitosamente en modelos *in vivo*. Algunos de ellos han sido probados en forma adicional en pruebas clínicas. El anticuerpo humanizado específico de C5, eculizumab, está aprobado para hemoglobinuria nocturna paroxismal, y ha mostrado eficacia en el tratamiento del síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), rechazo agudo de aloinjerto de riñón mediado por anticuerpo y enfermedad de aglutinina fría. Evita la escisión de C5 e inhibe la acción tanto de C5a como de C5b. Además son de especial interés anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de C5 en etapa de investigación, anticuerpos que interrumpen selectivamente la interacción de C5a:C5aR (CD88) y dejan sin afectar la escisión de C5 y la formación de MAC dependiente de C5b. Los ejemplos son el mAb anti-C5a humanizado, MED17814 que está en desarrollo clínico en fase I para un tratamiento potencial por IV de trastornos inflamatorios y lesión de tejido, y el anticuerpo de C5a, TNX-558 para el cual, sin embargo, no se ha descrito ningún desarrollo desde 2007. Un anticuerpo para el receptor C5a, neutrazumab, está en desarrollo para artritis reumatoide e ictus (Ricklin & Lambris 2007; Wagner & Frank 2010).

Un aptámero anti-C5 PEGilado (ARC-1905) está en desarrollo preclínico para AMD. CCX168 es una pequeña molécula inhibidora de C5aR actualmente en desarrollo clínico en fase II para vasculitis asociadas a autoanticuerpos citoplásmicos anti-neutrófilos (ChemoCentryx Press Release Oct 17, 2011). Otro antagonista de C5aR en desarrollo clínico es MP-435, para el tratamiento de artritis reumatoide.

Recientemente no se ha descrito ningún desarrollo de los antagonistas del receptor de C5a de molécula pequeña/peptidomimético JPE-1375, JSM-7717 (Ricklin & Lambris 2007). Otro inhibidor del CD88 receptor de C5a, el hexapeptido cíclico PMX53, ha sido eficaz en modelos animales inflamatorios, pero no ha cumplido con los puntos extremos en estudios clínicos doble ciegos controlados por placebo en pacientes con artritis reumatoide. El desarrollo clínico de AMD también ha sido discontinuado (Wagner & Frank 2010). Una variante en estadio de investigación de PMX53, PMX205, ha sido publicada como activa en un modelo de múrido de demencia de Alzheimer (Fonseca et al. 2009). Un compuesto adicional en estadio clínico es el antagonista de receptor de C5a (C5aR), CCX-168. En enero de 2010 se inició una prueba en fase I para enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

Además de los efectos de C5a tal como se describe *supra*, los nuevos datos permiten suponer que la generación de C5a en un microambiente de tumor incrementa el crecimiento del tumor por la supresión de la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T CD8+, por lo cual dicha supresión parece estar asociada con el reclutamiento de células supresoras derivadas de mieloide en tumores, y el aumento de sus capacidades supresoras dirigidas a linfocitos T. Markiewski et al. mostraron que un bloqueo de los receptores de C5a por un antagonista peptídico de receptor de C5a conduce a un crecimiento retardado de tumor en un modelo de ratón (Markiewski et al., 2008).

La mayor parte de los compuestos peptídicos son propensos a degradación y modificación por peptidasas, y muestran de forma adicional una tasa rápida de eliminación del cuerpo, preferentemente el cuerpo humano. Por lo tanto, estos compuestos peptídicos no pueden ser considerados como moléculas de tipo fármaco, un prerequisito para el desarrollo de fármacos que serán comercializados en general.

En el pasado se desarrollaron diversos espiegélmeros que en unen específicamente a C5a humana, pero no a C5a de otras especies (véase WO2009/040113 y WO2010/108657).

Vater et al., (Vater et al., Molecular Immunology, vol. 47, no. 13 1 August 2010, p. 2290) describieron la identificación y caracterización de aptámeros bioestables que inhiben C5a.

La solicitud de patente internacional WO 99/41271 se refiere a la identificación y preparación de ligandos de ácidos nucleicos de alta afinidad para las proteínas del sistema del complemento.

Eaton BE et al., (Bioorganic & Medicinal Chemistry vol. 5, no. 6, 1 January 1997, pp. 1087-1096) describieron la optimización combinatoria post-SELEX de aptámeros.

Debido a que son esenciales modelos animales para el desarrollo preclínico y clínico, el problema que subyace en la presente invención es proporcionar un compuesto que interactúe con C5a de ratón. Más específicamente, el problema que subyace en la presente invención, es proporcionar un compuesto que interactúe tanto con C5a de ratón como C5a humana.

Un problema adicional que subyace en la presente invención es proporcionar un compuesto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades humanas y/o no humanas, por lo que la enfermedad está caracterizada por que C5a está implicada directa o indirectamente en el mecanismo patogenético de dicha enfermedad.

- 5 Otro problema adicional que subyace en la presente invención, es proporcionar un compuesto para la fabricación de un agente de diagnóstico para el tratamiento de una enfermedad, por lo que la enfermedad está caracterizada por que C5a está implicada directa o indirectamente en el mecanismo patogénico de dicha enfermedad.

Estos y otros problemas que subyacen en la presente invención son resueltos por la materia objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas pueden tomarse de las reivindicaciones dependientes.

Más específicamente el problema que subyace en la presente invención se resuelve en un primer aspecto, que es también la primera realización del primer aspecto, por una molécula de ácido L-nucleico capaz de unirse a C5a humana y C5a de ratón, en donde la molécula de ácido nucleico comprende un tramo central de nucleótidos, en donde el tramo central de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de

- 15 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGKUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>RGGGHUGUKGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 61], en donde

n<sub>1</sub> es U o dU, n<sub>2</sub> es G o dG, n<sub>3</sub> es A o dA, n<sub>4</sub> es U o dU, n<sub>5</sub> es U o dU y

G, A, U, C, H, K y R son ribonucleótidos, y

dU, dG y dA son 2'-desoxirribonucleótidos.

20 En una segunda realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera realización del primer aspecto el tramo central de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de

a) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 62],

b) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGUUGUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 63],

c) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 64],

d) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 65],

e) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 66],

f) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGAUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 67], y

g) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGCUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 68],

en donde:

n<sub>1</sub> es U o dU, n<sub>2</sub> es G o dG, n<sub>3</sub> es A o dA, n<sub>4</sub> es U o dU, n<sub>5</sub> es U o dU y

G, A, U y C son ribonucleótidos, y

- 25 dU, dG y dA son 2'-desoxirribonucleótidos.

En una tercera realización del primer aspecto, que es también una realización de la segunda realización del primer aspecto, el tramo central de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 65]

en donde

- 30 n<sub>1</sub> es U o dU, n<sub>2</sub> es G o dG, n<sub>3</sub> es A o dA, n<sub>4</sub> es U o dU, n<sub>5</sub> es U o dU y

G, A, U y C son ribonucleótidos, y

dU, dG y dA son 2'-desoxirribonucleótidos.

En una cuarta realización del primer aspecto, que es también es una realización de la tercera realización del primer aspecto, el tramo central de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de:

- a) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 73],
- b) 5' AUGUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 74],
- c) 5' AUGUGGUGGUdAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 75],
- d) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 76],
- e) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 77],
- f) 5' AUGdUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGdUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 78],
- g) 5' AUGdUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 79],
- h) 5' AUGUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 80],
- i) 5' AUGdUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA 3'[SEQ ID NO: 81],
- j) 5' AUGdUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 82],
- k) 5' AUGdUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 83],
- l) 5' AUGdUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 84],

preferentemente el tramo central de nucleótidos es

5' AUGdUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGdUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 78] o  
 5' AUGdUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 84].

En una quinta realización del primer aspecto, que es también una realización de la segunda realización del primer aspecto, el tramo central de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 66], en donde

n<sub>1</sub> es U o dU, n<sub>2</sub> es G o dG, n<sub>3</sub> es A o dA, n<sub>4</sub> es U o dU, n<sub>5</sub> es U o dU y

G, A, U y C son ribonucleótidos, y

dU, dG y dA son 2'-desoxirribonucleótidos.

10 En una sexta realización del primer aspecto, que es también una realización de la segunda realización del primer aspecto, el tramo central de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGGAUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 67], en donde

n<sub>1</sub> es U o dU, n<sub>2</sub> es G o dG, n<sub>3</sub> es A o dA, n<sub>4</sub> es U o dU, n<sub>5</sub> es U o dU y

G, A, U y C son ribonucleótidos, y

15 dU, dG y dA son 2'-desoxirribonucleótidos.

En una séptima realización del primer aspecto, que es también una realización de la segunda realización del primer aspecto, el tramo central de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 64], en donde

n<sub>1</sub> es U o dU, n<sub>2</sub> es G o dG, n<sub>3</sub> es A o dA, n<sub>4</sub> es U o dU, n<sub>5</sub> es U o dU y

20 G, A, U y C son ribonucleótidos, y

dU, dG y dA son 2'-desoxirribonucleótidos.

En una octava realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima realización del primer aspecto, el tramo central de nucleótidos consiste en ribonucleótidos y 2'-desoxirribonucleótidos.

25 En una novena realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, segunda, tercera, quinta, sexta y séptima realización del primer aspecto, el tramo central de nucleótidos consiste en ribonucleótidos.

En una décima realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava y novena realización del primer aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende en la dirección 5'>3' un primer tramo terminal de nucleótidos, el tramo central de nucleótidos y un segundo tramo terminal de nucleótidos, en donde

el primer tramo terminal de nucleótidos comprende uno a cinco nucleótidos, y

el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende uno a cinco nucleótidos, preferentemente

el primer tramo terminal de nucleótidos comprende tres a cinco nucleótidos, y  
 el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende tres a cinco nucleótidos, más preferentemente  
 el primer tramo terminal de nucleótidos comprende tres nucleótidos, y  
 el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende tres nucleótidos.

- 5 En una décimo primera realización del primer aspecto, que es también una realización de la décima realización del primer aspecto, el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub>Z<sub>4</sub>G 3'  
 y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' Z<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>Z<sub>7</sub>Z<sub>8</sub>Z<sub>9</sub> 3',  
 en donde
- 10 Z<sub>1</sub> es G o está ausente, Z<sub>2</sub> es S o está ausente, Z<sub>3</sub> es S o está ausente, Z<sub>4</sub> es B o está ausente, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub>  
 es V o está ausente, Z<sub>7</sub> es S o está ausente, Z<sub>8</sub> es S o está ausente, Z<sub>9</sub> es C o está ausente, y  
 G, S, B, C, V son ribonucleótidos, y  
 dC es un 2'-desoxirribonucleótido,  
 preferentemente
- a) Z<sub>1</sub> es G, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> es C, o  
 b) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> está ausente, o  
 c) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o  
 d) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o  
 e) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> es C, o  
 f) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> es C, o  
 g) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> es C, o  
 h) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> está ausente, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> es C, o  
 i) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> está ausente, o  
 j) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> está ausente, o  
 k) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> está ausente, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> está ausente, o  
 l) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o  
 m) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o  
 n) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> está ausente, Z<sub>5</sub> es C, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o  
 o) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o  
 p) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o  
 q) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> está ausente, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente.
- 30 En una décimo segunda realización del primer aspecto, que es también una realización de la décima y décimo primera realización del primer aspecto, el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCCUG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CAGGC 3' o de 5' dCAGGC 3', en donde
- 35
- 40

- C, A, G y U son ribonucleótidos y  
dC es un 2'-desoxirribonucleótido.
- En una décimo tercera realización del primer aspecto, que es también una realización de la décimo segunda realización del primer aspecto, el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAGGC 3'.
- 5 En una décimo cuarta realización del primer aspecto, que es también una realización de la décimo segunda realización del primer aspecto, el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CAGGC 3'.
- 10 En una décimo quinta realización del primer aspecto, que es también una realización de la décima y décimo primera realización del primer aspecto, el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CCUG 3' o 5' CUG 3' o 5' UG 3' o 5' G 3', y  
el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAGGC 3', en donde  
C, A, G y U son ribonucleótidos, y  
dC es un 2'-desoxirribonucleótido.
- 15 En una décimo sexta realización del primer aspecto, que es también una realización de la décimo quinta realización del primer aspecto, el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CCUG 3'.
- En una décimo séptima realización del primer aspecto, que es también una realización de la décimo quinta realización del primer aspecto, el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CUG 3'.
- 20 En una décimo octava realización del primer aspecto, que es también una realización de la décima y décimo primera realización del primer aspecto,  
 a) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCUG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAGC 3'; o  
 b) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCGGC 3'; o  
 c) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GGCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dGCC 3'; en donde  
C, A, G y U son ribonucleótidos, y  
dC es un 2'-desoxirribonucleótido.
- 30 En una décimo novena realización del primer aspecto, que es también una realización de la décimo octava realización del primer aspecto, el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GGCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dGCC 3'.
- En una vigésima realización del primer aspecto, que es también una realización de la décima y décimo primera realización del primer aspecto, el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CUG 3' o 5' UG 3' o 5' CG 3' o 5' G 3', y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAGC 3', en donde  
C, A, G y U son ribonucleótidos, y  
dC es un 2'-desoxirribonucleótido.
- 35 En una vigésimo primera realización del primer aspecto, que es también una realización de la décima y décimo primera realización del primer aspecto, el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCUG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAC 3' o 5' dCC 3' o 5' dCA 3', en donde  
C, A, G y U son ribonucleótidos, y  
dC es un 2'-desoxirribonucleótido.
- 40 En una vigésimo segunda realización del primer aspecto, que es también una realización de la décima y décimo primera realización del primer aspecto, el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAGC 3' o 5' dCGC 3' o 5' dCG 3', en donde  
C, A, G y U son ribonucleótidos, y  
dC es un 2'-desoxirribonucleótido.
- 45 En una vigésimo tercera realización del primer aspecto, que es también una realización de la décima y décimo primera realización del primer aspecto,

a) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GUG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAC 3'; o

b) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' UG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCA 3'; o

5 c) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCGC 3'; o

d) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCGC 3'; o

10 e) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' G 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCGC 3'; o

f) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCC 3'; o

g) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dC 3'; o

15 h) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCC 3';

i) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CGC 3'; en donde

C, A, U y G son ribonucleótidos, y

20 dC es un 2'-desoxirribonucleótido.

En una vigésimo tercera realización del primer aspecto, que es también una realización de la vigésimo segunda realización del primer aspecto, el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCG 3', y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCGC 3'.

25 En una vigésimo cuarta realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, segunda, tercera, quinta, sexta, séptima, novena, decima, décimo primera, décimo segunda y décimo cuarta realización del primer aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 90, o una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos el 85% con la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 90, o una molécula de ácido nucleico que es homóloga a la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 90, en donde la homología es al menos 85%.

35 En una vigésimo quinta realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, octava, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup> y 23<sup>a</sup> realización del primer aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92, o una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos el 85% con la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de 14, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92, o una molécula de ácido nucleico que es homóloga a la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de 14, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92, en donde la homología es al menos el 85%.

40 En una vigésimo sexta realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup> y 25<sup>a</sup> realización del primer aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende al menos una resto de unión que es capaz de unirse a C5a humana y C5a de ratón, en donde dicho resto de unión consiste en L-nucleótidos.

45 En una vigésimo séptima realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup> y 26<sup>a</sup> realización del primer aspecto, los nucleótidos o los nucleótidos que forman la molécula de ácido nucleico son L-nucleótidos.

En una vigésimo octava realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup> y 27<sup>a</sup> realización del primer aspecto, el ácido nucleico es un antagonista de una actividad mediada por C5a humana y/o de ratón.

- 5 En una vigésimo novena realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup> y 28<sup>a</sup> realización del primer aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende un grupo de modificación, en donde la tasa de excreción de la molécula de ácido nucleico que comprende el grupo de modificación procedente de un organismo está disminuida en comparación con la de un ácido nucleico que no comprende el grupo de modificación.

- 10 En una trigésima realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup> y 28<sup>a</sup> realización del primer aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende un grupo de modificación en donde la molécula de ácido nucleico que comprende el grupo de modificación tiene una mayor tiempo de retención en un organismo en comparación con el de una molécula de ácido nucleico que no comprende el grupo de modificación.

- 15 En una trigésimo primera realización del primer aspecto, que es también una realización de la 29<sup>a</sup> y 30<sup>a</sup> realización del primer aspecto, el grupo de modificación se selecciona del grupo que comprende modificaciones biodegradables y no biodegradables, preferiblemente el grupo de modificación se selecciona del grupo que comprende polietilenglicol, polietilenglicol lineal, polietilenglicol ramificado, hidroxietil-almidón, un péptido, una proteína, un polisacárido, un esterol, polioxipropileno, polioxiamidato y poli(2-hidroxietil)-L-glutamina.

- 20 En una trigésimo segunda realización del primer aspecto, que es también una realización de la trigésimo primera realización del primer aspecto, el grupo de modificación es un polietilenglicol, que consiste preferentemente en un polietilenglicol lineal o polietilenglicol ramificado, en donde el peso molecular del polietilenglicol es preferentemente de aproximadamente 20.000 hasta aproximadamente 120.000 Da, más preferentemente de aproximadamente 30.000 hasta aproximadamente 80.000 Da y lo más preferentemente de aproximadamente 40.000 Da.

- 25 En una trigésimo tercera realización del primer aspecto, que es también una realización de la trigésimo primera realización del primer aspecto, el grupo de modificación es hidroxietil-almidón, en donde preferentemente el peso molecular del hidroxietil-almidón es desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferentemente desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 700 kDa y lo más preferentemente desde 200 hasta 500 kDa.

- 30 En una trigésimo cuarta realización del primer aspecto, que es también una realización de la 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup> y 33<sup>a</sup> realización del primer aspecto, el grupo de modificación está acoplado a la molécula de ácido nucleico mediante un enlazador, por lo cual preferentemente el enlazador es un enlazador biodegradable.

- 35 En una trigésimo quinta realización del primer aspecto, que es también una realización de la 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup> y 34<sup>a</sup> realización del primer aspecto, el grupo de modificación está acoplado al nucleótido 5'-terminal y/o nucleótido 3'-terminal de la molécula de ácido nucleico y/o a un nucleótido de la molécula de ácido nucleico entre el nucleótido 5'-terminal de la molécula de ácido nucleico y el nucleótido 3'-terminal de la molécula de ácido nucleico.

- 40 En una trigésimo sexta realización del primer aspecto, que es también una realización de la 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup> y 35<sup>a</sup> realización del primer aspecto, el organismo es un animal o un ser humano, preferentemente un ser humano.

- 45 El problema que subyace en la presente invención se resuelve en un segundo aspecto, que es también la primera realización del segundo aspecto por una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto, para uso en un método para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.

- 50 En una segunda realización del segundo aspecto, que es también una realización de la primera realización del segundo aspecto, la enfermedad está asociada a mecanismos de activación del complemento y patógenos mediados por C5a; y/o se selecciona del grupo que comprende enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, enfermedad de los ojos, lesiones por isquemia/reperfusión, función de injerto retardada, rechazo de trasplante, enfermedad cardiovascular, enfermedad respiratoria, reacciones agudas, enfermedad infecciosa, enfermedad neurológica, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad fibrótica, enfermedad hematológica, enfermedad metabólica, tumores y complicaciones clínicas asociadas con activación del complemento por biomateriales, preferentemente el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica se selecciona del grupo que comprende septicemia y daños secundarios de traumatismos o quemaduras graves.

El problema que subyace en la presente invención se soluciona en un tercer aspecto, que es también la primera realización del tercer aspecto por una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> / 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, y opcionalmente un constituyente adicional, en donde el constituyente adicional se selecciona del grupo que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable, un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente farmacéuticamente activo.

En una segunda realización del tercer aspecto, que es también una realización de la primera realización del tercer aspecto, la composición farmacéutica comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El problema que subyace en la presente invención se soluciona en un cuarto aspecto, que es también la primera realización del cuarto aspecto por el uso de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, para la fabricación de un medicamento.

En una segunda realización del cuarto aspecto, que es también una realización de la primera realización del cuarto aspecto, el medicamento es para uso en medicina humana o para uso en medicina veterinaria.

En una tercera realización del cuarto aspecto, que es también una realización de la primera y la segunda realización del cuarto aspecto, el medicamento es para el tratamiento y/o la prevención de enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, enfermedad de los ojos, lesiones de isquemia/reperfusión, función de injerto retardada, rechazo de trasplante, enfermedad cardiovascular, enfermedad respiratoria, reacciones agudas, enfermedad infecciosa, enfermedad neurológica, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad fibrótica, enfermedad hematológica, enfermedad metabólica, tumores y complicaciones clínicas asociadas a la activación del complemento por biomateriales, preferentemente el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica se selecciona del grupo que comprende septicemia y daños secundarios de traumatismos o quemaduras graves.

El problema que subyace en la presente invención se resuelve en un quinto aspecto, que es también la primera realización del quinto aspecto, por el uso de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, para la fabricación de un medio de diagnóstico.

El problema que subyace en la presente invención se resuelve en un sexto aspecto, que es también la primera realización del sexto aspecto por un complejo que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, y C5a, en donde preferentemente el complejo es un complejo cristalino.

El problema que subyace en la presente invención se resuelve en un séptimo aspecto, que es también la primera realización del séptimo aspecto, por el uso de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, para la detección de C5a.

El problema que subyace la presente invención se resuelve en un octavo aspecto, que es también la primera realización del octavo aspecto por un método para el cribado de un antagonista de una actividad mediada por C5a, que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar un candidato antagonista de la actividad mediada por C5a,
- proporcionar una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto.
- proporcionar un sistema de ensayo que proporcione una señal en presencia de un antagonista de la actividad mediada por C5a, y

- determinar si el candidato antagonista de la actividad mediada por C5a es un antagonista de la actividad mediada por C5a.

El problema que subyace la presente invención se resuelve en un noveno aspecto, que es también la primera realización del noveno aspecto, por un kit para la detección de C5a, en donde el kit comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, y al menos un folleto de instrucciones o un recipiente de reacción.

El problema que subyace la presente invención se resuelve en un décimo aspecto, que es también la primera realización del décimo aspecto, por un método para la detección de un ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, en una muestra, en donde el método comprende los etapas de:

- 15 a) proporcionar una sonda de captura, en donde la sonda de captura es al menos parcialmente complementaria de una primera parte de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, y una sonda de detección, en donde la sonda de detección es al menos parcialmente complementaria de una segunda parte de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, o alternativamente, la sonda de captura es al menos parcialmente complementaria de una segunda parte de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto;
- 30 b) añadir la sonda de captura y la sonda de detección por separado o combinadas a una muestra que contiene la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, o que se supone que contiene la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto;
- 35 c) permitir que la sonda de captura y la sonda de detección reaccionen ya sea en forma simultánea o en cualquier orden secuencial con la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, o una de sus partes;
- 40 d) detectar opcionalmente si la sonda de captura se hibrida con la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, proporcionada en la etapa a); y
- 45 e) detectar el complejo formado en la etapa c) que consiste en la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, y la sonda de captura y la sonda de detección.

En una segunda realización del décimo aspecto, que es también una realización de la primera realización del décimo aspecto, la sonda de detección comprende un medio de detección y/o en donde la sonda de captura está inmovilizada en un soporte, preferentemente un soporte sólido.

En una tercera realización del décimo aspecto, que es también una realización de la primera y segunda realización del décimo aspecto, cualquier sonda de detección que no es parte del complejo formado en la etapa c) se elimina de la reacción de modo que en la etapa e) únicamente se detecte una sonda de detección que es parte del complejo.

- 5 En una cuarta realización del décimo aspecto, que es también una realización de la primera, segunda y tercera realización del décimo aspecto, la etapa e) comprende la etapa de comparar la señal generada por el medio de detección cuando la sonda de captura y la sonda de detección se hibridan en presencia de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, décimo primera, décimo segunda, 13<sup>a</sup>, 14<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup>, 19<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 21<sup>a</sup>, 22<sup>a</sup>, 23<sup>a</sup>, 24<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 27<sup>a</sup>, 28<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 10 31<sup>a</sup>, 32<sup>a</sup>, 33<sup>a</sup>, 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> y 36<sup>a</sup> realización del primer aspecto y de acuerdo con la primera realización del segundo aspecto, o una de sus partes y en su ausencia.

Sin pretender limitarse a teoría alguna, los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se une específicamente y con alta afinidad tanto a C5a de ratón como a C5a humana, para inhibir de esta forma la unión de C5a a su receptor de C5a, aunque la homología de secuencias de C5a de ratón y C5a humana es únicamente el 64% en la región homóloga y teniendo la 15 C5a de ratón 3 aminoácidos N-terminal adicionales. Además, en contraste con C5a humana, C5a de ratón no está glicosilada. La asparagina 64, el sitio de glicosilación en C5a humana, está mutada a glutamato en el ratón. En particular no podía preverse la afinidad mostrada de varios ácidos nucleicos individuales de unión a C5a en el intervalo picomolar.

Además, los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es adecuada para bloquear la interacción de C5a con el receptor de C5a. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también puede ser vista como un antagonista del receptor de C5a, y respectivamente, como un antagonista de los efectos de C5a, en particular los efectos de C5a en su receptor. Un antagonista de C5a es una molécula de unión a C5a – tal como las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención – e inhibe la función de C5a, preferentemente en un ensayo *in vitro* o en un modelo *in vivo* tal como se describe en los Ejemplos.

Está dentro de la presente invención que el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención sea una molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, los términos ácido nucleico y molécula de ácido nucleico se utilizan en la presente invención en una forma sinónima si no se indica lo contrario. Además, dicho ácido(s) nucleico(s) es/son también preferentemente denominado(s) en la presente memoria como la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) de acuerdo con la presente invención, el(los) ácido(s) de acuerdo con la presente invención, el(los) ácido(s) nucleico(s) de la invención y la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) de la invención.

Las características de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención tal como se describen en la presente memoria, también pueden ser realizadas en cualquier aspecto de la presente invención en donde se utilice el ácido nucleico, ya sea solo o en cualquier combinación.

35 Como para diversas enfermedades, estados y trastornos que pueden ser tratados o prevenidos utilizando la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y las composiciones, preferentemente las 40 composiciones farmacéuticas que las comprenden, se ha de reconocer que dichas enfermedades, estados y trastornos son los que aquí se describen, incluyendo y en particular, los descritos y establecidos en la parte introductoria de la presente solicitud. Por lo tanto, los pasajes respectivos de la memoria y la parte introductoria de la memoria forman una parte integral de la presente descripción que enseña la conveniencia de la molécula de ácido nucleico de la presente invención para la prevención y el tratamiento, respectivamente, de dichas enfermedades, estados y trastornos. Además, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es preferida, si el efecto fisiológico del eje C5a - receptor de C5a está relacionado con mayores niveles en plasma de C5a.

45 Tal como se utiliza en la presente invención, el término C5a se refiere a cualquier C5a que incluye, pero sin limitación, C5a de mamífero. Preferentemente, la C5a de mamífero se selecciona del grupo que comprende C5a humana, de rata, de ratón, de mono (véase la alineación de especies de C5a en la Figura 11). Más preferentemente la C5a es C5a humana. La C5a humana es una proteína básica que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ. ID. No. 50. La C5a de ratón es una proteína básica que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ. ID. No. 52.

50 Tal como se describe con mayor detalle en las reivindicaciones y en el ejemplo 1, los autores de la presente invención pudieron identificar más sorprendentemente un número de diferentes moléculas de ácido nucleico de unión capaces de unirse tanto a C5a humana como de ratón.

55 Tal como se explica con mayor detalle en la presente invención, los inventores de la misma han identificado un número de diferentes moléculas de ácido nucleico de unión a C5a capaces de unirse tanto a C5a humana como de ratón, por lo cual las moléculas de ácido nucleico pueden estar caracterizadas en términos de tramos de nucleótidos que también son citados en la presente invención tal como los descritos (véase el Ejemplo 1). Tal como se muestra experimentalmente en los ejemplos 8 y 9, los inventores pudieron demostrar sorprendentemente en varios sistemas,

que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es adecuada para el tratamiento de septicemia.

Cada uno de los diferentes tipos de moléculas de ácido nucleico de unión a C5a de la presente invención, comprenden tres diferentes tramos de nucleótidos: un primer tramo terminal de nucleótidos, un tramo central de nucleótidos y un segundo tramo terminal de nucleótidos. En general, las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a de la presente invención comprenden en su extremo 5' y en el extremo 3' cada uno de los tramos terminales de nucleótidos, es decir, el primer tramo terminal de nucleótidos del segundo tramo terminal de nucleótidos (también denominado el tramo 5'-terminal de nucleótidos y el tramo 3'-terminal de nucleótidos). El primer tramo terminal de nucleótidos y el segundo tramo terminal de nucleótidos pueden, en principio debido a su complementariedad de bases, hibridarse, mediante lo cual por hibridación se forma una estructura bicatenaria. Sin embargo, dicha hibridación no se realiza necesariamente en la molécula bajo condiciones fisiológicas y/o no fisiológicas. Los tres tramos de nucleótidos de las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a – el primer tramo terminal de nucleótidos, el tramo central de nucleótidos y el segundo tramo terminal de nucleótidos – están dispuestos uno respecto a los otros en la dirección 5' → 3': el primer tramo terminal de nucleótidos – el tramo central de nucleótidos – el segundo tramo terminal de nucleótidos. Alternativamente, el segundo tramo terminal de nucleótidos, el tramo central de nucleótidos y el primer tramo terminal de nucleótidos están dispuestos uno respecto a los otros en la dirección 5' → 3'.

La longitud del tramo central de nucleótidos de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención es preferentemente 34.

La longitud del primer tramo terminal de nucleótidos de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, es entre uno y cinco nucleótidos, preferentemente entre tres y cinco nucleótidos, más preferentemente tres nucleótidos.

La longitud del segundo tramo terminal de nucleótidos del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, es entre uno y cinco nucleótidos, preferentemente entre tres y cinco nucleótidos, más preferentemente tres nucleótidos.

Los términos "tramo" y "tramo de nucleótidos" tal como se utilizan en la presente invención, son sinónimos si no se indica lo contrario.

Las diferencias en las secuencias de los tramos definidos entre las diferentes moléculas de ácido nucleico de unión a C5a pueden influir en la afinidad con la de unión a C5a. Con base en el análisis de unión de diferentes moléculas de ácido nucleico de unión a C5a de la presente invención, el tramo central y los nucleótidos que forman el mismo son individualmente, y más preferentemente en su totalidad, esenciales para la unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, a C5a.

En una realización preferida la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es una molécula de ácido nucleico sencilla. En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico sencilla está presente como una pluralidad de moléculas de ácido nucleico sencillas o como una pluralidad de especies de moléculas de ácido nucleico sencillas.

Los expertos en la técnica reconocerán que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención consiste preferentemente en nucleótidos que están enlazados covalentemente entre sí, preferentemente a través de unión as o ligamientos de fosfodiéster.

Está dentro de la presente invención que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprenda dos o más tramos o un(a) de su(s) parte(s) que puedan, en principio, hibridar entre sí. Por dicha hibridación se forma una estructura bicatenaria. Los expertos en la técnica reconocerán que dicha hibridación puede ocurrir o no particularmente bajo condiciones *in vitro* y/o *in vivo*. Asimismo, en el caso de hibridación, dicha hibridación no ocurre necesariamente en toda la longitud de los dos tramos en donde, al menos en base en las reglas del apareamiento de bases, puede ocurrir en principio dicha hibridación y por lo tanto la formación de una estructura bicatenaria. Tal como se utiliza preferentemente en la presente memoria, una estructura bicatenaria es una parte de una molécula de ácido nucleico o de una estructura formada por dos o más cadenas separadas o dos tramos espacialmente separados de una sola cadena de una molécula de ácido nucleico, por lo cual existe al menos uno, preferentemente dos o más pares de bases que se aparean preferentemente de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Los expertos en la técnica también reconocerán que pueden tener lugar otros apareamientos de bases, tal como apareamiento de bases de Hoogsten, o pueden formar dicha estructura bicatenaria. También se reconocerá que la característica de que dos tramos se hibriden, indica preferentemente que se supone que dicha hibridación sucede debido a la complementariedad de bases de los dos tramos sin importar si ocurre realmente la hibridación *in vivo* y/o *in vitro*. En relación con la presente invención, dichos tramos son el primer tramo terminal de nucleótidos y el segundo tramo de nucleótidos, las cuales, en una realización, pueden hibridarse tal como se definió anteriormente.

En una realización preferida, el término disposición tal como se utiliza en la presente invención, significa el orden o secuencia de características o elementos estructurales o funcionales aquí descritos en relación con la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) aquí descrita(s).

Los expertos en la técnica reconocerán que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención tienen la capacidad de unirse tanto a C5a como a C5. Esta característica de unión surge del hecho de que, para la identificación de los ácidos nucleicos, se utilizó un resto de C5a que está presente tanto en C5a como en C5. Por consiguiente, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención son adecuados para detección ya sea de C5a o de C5 o de ambas. Asimismo, los expertos en la técnica reconocerán que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es un antagonista tanto para C5 como para C5a. Debido a que estos ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención son adecuados para el tratamiento y la prevención, respectivamente, de cualquier enfermedad que esté asociada con, o sea causada ya sea por C5a o C5 o por ambas. La explicación científica puede tomarse de la técnica anterior que establece que C5a y C5, respectivamente, están implicadas o asociadas con una variedad de enfermedades y estados respectivamente.

La molécula de ácido nucleico de unión a C5a de la presente invención aquí descrita, ha mostrado reconocer C5a dentro del contexto de C5 (véase Ejemplo 1). Por consiguiente, se investigó si la escisión de C5 en las anafilatoxinas C5a y C5b, que son parte del complejo del ataque a membranas (MAC) es inhibida por ácidos nucleicos de unión a C5a. El MAC es el producto final de la cascada del complemento: un poro que consiste en C5b-9. Se cree que MAC se inserta en las membranas citoplásmicas de los patógenos y los extermina por inducción de fuga citoplásmica. El ensayo para determinar la escisión de C5 se realizó usando una prueba de hemólisis de eritrocitos de oveja dependiente del complemento. La molécula de unión a C5a de la invención no inhibió la hemólisis (véase el Ejemplo 6). La molécula de ácido nucleico de unión a C5a de la invención no interfiere con la escisión de C5 ni con la formación de MAC, y por consiguiente son únicamente antagonistas selectivos de C5a. Si se utiliza como medicamento, esto puede ser conveniente en muchas enfermedades, ya que la formación del MAC que es beneficiosa en la defensa del patógeno no está comprometida en su presencia.

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también comprenderá ácidos nucleicos que son esencialmente homólogos a las secuencias particulares aquí descritas. El término "sustancialmente homóloga" debe entenderse de tal modo que la homología sea al menos 75%, preferentemente 85%, más preferentemente 90% y más preferentemente mayor que 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99%.

El porcentaje real de los nucleótidos homólogos presentes en el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, dependerá del número total de nucleótidos presentes en el ácido nucleico. El porcentaje de modificación puede estar basado en el número total de nucleótidos presentes en el ácido nucleico.

La homología entre las moléculas de ácido nucleico se puede determinar como saben los expertos en la técnica. Más específicamente, se puede usar un algoritmo de comparación de secuencias para calcular el porcentaje de homología de secuencias para la(s) secuencia(s) de ensayo con relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa diseñado. La secuencia de ensayo es preferentemente la secuencia o molécula de ácido nucleico que se considera homóloga o que ha de analizar para determinar si es homóloga, y si es así, hasta qué grado, de una molécula de ácido nucleico diferente, por lo cual dicha molécula de ácido nucleico diferente también se denomina la secuencia de referencia. En una realización, la secuencia de referencia es una molécula de ácido nucleico tal como aquí se describe, preferentemente una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92. La alineación óptima de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman (Smith & Waterman, 1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch (Needleman & Wunsch, 1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson & Lipman (Pearson & Lipman, 1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Programa informático Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual.

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias, es el algoritmo utilizado en la herramienta de búsqueda de alineación local básica (en lo sucesivo "BLAST"), véase por ejemplo la Altschul et al., (Altschul et al. 1990 and Altschul et al., 1997). El programa informático para llevar a cabo el análisis BLAST está públicamente disponible en el National Center for Biotechnology Information (en lo sucesivo "NCBI"). Los parámetros por defecto utilizados para determinar la identidad de secuencias que utiliza el programa informático disponible en NCBI, por ejemplo, BLASTN (para secuencias de nucleótidos) y BLASTP (para secuencias de aminoácidos) están descritos McGinnis et al., (McGinnis et al, 2004).

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención también deben comprender ácidos nucleicos que tienen un cierto grado de identidad con relación a los ácidos nucleicos aquí descritos y definidos por su secuencia de nucleótidos. Más preferentemente, la presente invención también comprende las moléculas de ácido nucleico que tienen una identidad de al menos 75%, preferentemente 85%, más preferentemente 90% y más preferentemente más del 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con relación a los ácidos nucleicos aquí descritos y definidos por su secuencia de nucleótidos o una de sus partes.

El término ácido nucleico de la presente invención o ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también deben comprender los ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos aquí descritas o parte

de las mismas, preferentemente hasta el grado en que los ácidos nucleicos o dichas partes estén implicados en la unión a C5a humana. Dicho ácido nucleico, es en una realización, una de las moléculas de ácido nucleico aquí descritas, o uno de sus derivados y/o de sus metabolitos, con lo cual dicho derivado y/o metabolito es preferentemente un ácido nucleico truncado en comparación con las moléculas de ácido nucleico aquí descritas. El truncamiento puede estar relacionado ya sea con uno o ambos de los extremos de los ácidos nucleicos tal como aquí se describen. Asimismo, el truncamiento puede estar relacionado con la secuencia interna de los nucleótidos del ácido nucleico, es decir, puede estar relacionado con el (los) nucleótido(s) entre el nucleótido terminal en 5' y 3', respectivamente. Además, el truncamiento debe comprender la delección de tan poco como un solo nucleótido de la secuencia de los ácidos nucleicos aquí descritos. El truncamiento también puede estar relacionado con más de un tramo del (de los) ácido(s) nucleico(s) de la invención, por lo cual el tramo puede ser de una longitud tan pequeña como un nucleótido. La unión de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede ser determinada por un experto en la técnica utilizando experimentos de rutina o utilizando o adoptando un método tal como los aquí descrito, preferentemente tal como aquí se describe en la parte de los ejemplos.

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede ser ya sea una molécula de ácido D-nucleico o una molécula de ácido L-nucleico. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es una molécula de ácido L-nucleico. Más preferentemente, la molécula de ácido nucleico de la presente invención es un espiegelmero.

También está dentro de la presente invención que, en una realización, cada una y cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aquí descritas en su totalidad en términos de su(s) secuencia(s) de ácido nucleico, se limiten a la(s) secuencia(s) de nucleótidos indicada en particular. En otras palabras, los términos "que comprende" o "comprende(n)" deben interpretarse en dicha realización dentro del significado de que contiene o consiste en.

Está también dentro de la presente invención que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención son parte de un ácido nucleico más largo, por lo cual este ácido nucleico más largo comprende varias partes, por lo que al menos una de dichas partes es un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o una de sus partes. La(s) otra(s) parte(s) de estos ácidos nucleicos más largos puede(n) ser ya sea uno o varios ácidos D-nucleico o uno o varios ácidos L-nucleico. Cualquier combinación puede ser utilizada en relación con la presente invención. Esta(s) otra(s) parte(s) del ácido nucleico más largo ya sea sola o tomadas juntas, ya sea en su totalidad o en una combinación particular, puede exhibir una función que es diferente de la unión, preferentemente de la unión a C5a. Una posible función es permitir la interacción con otras moléculas, mediante lo cual dichas otras moléculas son preferentemente diferentes a C5a, tal como, por ejemplo, para inmovilización, reticulación, detección o amplificación. En una realización adicional de la presente invención, los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención comprenden, como restos individuales o combinados, varios de los ácidos nucleicos de la presente invención. Dicho ácido nucleico que comprende varios de los ácidos nucleicos de la presente invención también están comprendidos por el término ácido nucleico más largo.

Un ácido L-nucleico tal como se utiliza en la presente invención, es un ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico que consiste en L-nucleótidos, que consiste preferentemente totalmente en L-nucleótidos.

Un ácido D-nucleico tal como se utiliza en la presente invención, es ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico que consiste en D-nucleótidos, que consiste preferentemente totalmente de D-nucleótidos.

Los términos ácido nucleico y molécula de ácido nucleico se utilizan en la presente invención de manera intercambiable si no se indica explícitamente lo contrario.

Asimismo, si no se indica lo contrario, cualquier secuencia de nucleótidos se presenta en la presente invención en la dirección 5'→3'.

Tal como se utiliza preferentemente en la presente invención, cualquier posición de un nucleótido se determina o refiere con respecto al extremo 5' de una secuencia, un tramo o un subtramo que contiene dicho nucleótido. Por consiguiente, un segundo nucleótido es el segundo nucleótido contado desde el extremo 5' de la secuencia, tramo y subtramo, respectivamente. Asimismo, de acuerdo con esto, un penúltimo nucleótido es el segundo nucleótido contado desde el extremo 3' de una secuencia, tramo y subtramo, respectivamente.

Independientemente de si la molécula de ácido nucleico de la invención consiste en D-nucleótidos, L-nucleótidos o una combinación de ambos, con siendo la combinación, por ejemplo, una combinación aleatoria o una secuencia definida de tramos que consisten en al menos un L-nucleótido y al menos un ácido D-nucleico, consistiendo el ácido nucleico en desoxirribonucleótido(s), ribonucleótido(s) o sus combinaciones.

Está también dentro de la presente invención, que la molécula de ácido nucleico consista tanto en ribonucleótidos como en 2'-desoxirribonucleótidos. Los 2'-desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos se muestran en las Figuras 22 y 23. Con el objeto de distinguir entre ribonucleótidos y 2'-desoxirribonucleótidos en la secuencia de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, se utiliza en aquí el siguiente código de referencia.

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención consiste en 2'-desoxirribonucleótidos, en donde

dG es 2'-desoxi-guanosina-5'-monofosfato,  
dC es 2'-desoxi-citidina-5'-monofosfato,  
dA es 2'-desoxi-adenosina-5'-monofosfato,  
dU es 2'-desoxi-uridina-5'-monofosfato.

- 5 La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención consiste en ribonucleótidos, en donde  
G es guanosina-5'-monofosfato,  
C es citidina-5'-monofosfato,  
A es adenosina-5'-monofosfato,  
U es uridina-5'-monofosfato.
- 10 Para la definición de los motivos de secuencia de ribonucleótidos, se utilizan las abreviaturas de la IUPAC para nucleótidos ambiguos.

S	fuerte	G o C
W	débil	A o U
R	purina	G o A
Y	pirimidina	C o U
K	ceto	G o U
M	imino	A o C
B	no A	C o U o G
D	no C	A o G o U
H	no G	A o C o U
V	no U	A o C o G
N	todos	A o G o C o U

El diseño de la molécula de ácido nucleico de la presente invención como una molécula de ácido L-nucleico es conveniente por varias razones. Las moléculas de ácido L-nucleico son enantiómeros de ácidos nucleicos naturales.

- 15 Sin embargo, las moléculas de ácido D-nucleico no son muy estables en soluciones acuosas y particularmente en sistemas biológicos o muestras biológicas debido a la amplia presencia de nucleasas. Las nucleasas de origen natural, particularmente nucleasas de células animales no tienen la capacidad de degradar los ácidos L-nucleicos. Debido a esto, la semivida biológica de una molécula de ácido L-nucleico se incrementa significativamente en dicho sistema, incluyendo el cuerpo animal y humano. Debido a la carencia de capacidad de degradación de las moléculas  
20 de ácido L-nucleico, no se generan productos de degradación por nucleasas y por lo tanto no se observan efectos secundarios que surjan de los mismos en dicho sistema, incluyendo el cuerpo animal y humano. Este aspecto distingue objetivamente moléculas de ácido L-nucleico de los otros compuestos que son utilizados en terapia de enfermedades y/o trastornos que implican la presencia de C5. Una molécula de ácido L-nucleico que se une específicamente a una molécula diana a través de un mecanismo diferente del apareamiento de bases de Watson-Crick, o un aptámero que consiste parcial o completamente en L-nucleótidos, particularmente con las partes del  
25 aptámero que están implicadas en la unión del aptámero de la molécula diana, se denomina también un espiégelmero. Los aptámeros y espiégelmeros, tal como son conocidos por los expertos en la técnica, se describen, entre otras partes, en "The Aptamer Handbook" (eds. Klussmann, 2006).

- 30 También está dentro de la presente invención que la molécula de ácido nucleico de la invención, independientemente de si está presente como un ácido D-nucleico, ácido L-nucleico o ácido D,L-nucleico o si es un DNA o RNA, puede estar presente como una molécula de ácido nucleico de monocatenaria o bicatenaria. Normalmente, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico monocatenaria que exhibe una estructura secundaria definida debido a su secuencia primaria y también puede formar una estructura terciaria. Sin embargo, la molécula de ácido nucleico, también puede ser bicatenaria dentro del significado de que dos cadenas  
35 que son complementarias o parcialmente complementarias entre sí, se hibridan una con la otra.

- 40 La molécula de ácido nucleico de la invención puede ser modificada. Dicha modificación puede estar relacionada con un solo nucleótido de la molécula de ácido nucleico y es bien conocida en la técnica. Los ejemplos de dichas modificaciones se describen, entre otras publicaciones, en Venkatesan et al., (Venkatesan et al., 2003) y Kusser (Kusser, 2000). Dichas modificaciones pueden ser un átomo de H, un átomo de F o un grupo O-CH<sub>3</sub> o un grupo NH<sub>2</sub> en la posición 2' de uno, varios o todos los nucleótidos individuales de los cuales consiste la molécula de ácido

nucleico. Asimismo, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos un nucleótido de LNA. En una realización, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención consiste en nucleótidos de LNA.

5 En una realización, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede ser una molécula de ácido nucleico de partes múltiples. Una molécula de ácido nucleico de partes múltiples tal como aquí se utiliza, es una molécula de ácido nucleico que consiste en al menos en dos cadenas de ácido nucleico separadas. Estas al menos dos cadenas de ácido nucleico forman una unidad funcional, por lo que la unidad funcional es un ligando para una molécula diana, y preferentemente un antagonista para la molécula diana, en el caso de C5a. Las al menos dos cadenas de ácido nucleico pueden proceder de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de la invención ya sea 10 mediante escisión de una molécula de ácido nucleico de la invención para generar al menos dos cadenas, o mediante síntesis de una molécula de ácido nucleico que corresponde a una primera parte de la molécula de ácido nucleico de longitud total de la invención, y otra molécula de ácido nucleico que corresponde a otra parte de la molécula de ácido nucleico de longitud total de la invención. Dependiendo del número de partes que forman las moléculas de ácido nucleico de longitud total, se sintetizará el número de partes correspondientes que tienen la 15 secuencia de nucleótidos requeridas. Se reconoce que tanto el método de escisión como el método de síntesis pueden aplicarse para generar una molécula de ácido nucleico de partes múltiples en donde existen más de dos cadenas, tal como se ejemplificó anteriormente. En otras palabras, las al menos dos cadenas de ácido nucleico separadas normalmente son diferentes de dos cadenas que son complementarias y que se hibridan entre sí, aunque 20 puede haber un cierto grado de complementariedad entre dichas al menos dos cadenas de ácido nucleico separadas, y por lo que dicha complementariedad puede dar como resultado la hibridación de dichas cadenas separadas.

Finalmente, también está dentro de la presente invención que se realice una estructura completamente cerrada, es decir una estructura circular para la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, es decir, que 25 la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención esté cerrada en una realización, preferentemente a través de un enlace covalente, por lo que más preferentemente, dicho enlace covalente es entre el extremo 5' y el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico de la invención, tal como aquí se describe o cualquiera de sus derivados.

Una posibilidad para determinar las constantes de unión de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la 30 presente invención, es el uso de los métodos tal como se describen en los ejemplos 3 y 4, lo cual confirma el descubrimiento anterior de que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención exhiben un intervalo de valores de  $K_D$  favorable. Una medida adecuada con el objeto de expresar la intensidad de la unión entre la molécula de ácido nucleico individual y la diana que en el presente caso de C5a, es el valor llamado  $K_D$  el cual, así como el método para su determinación, es conocido por un experto en la técnica.

35 Preferentemente, el valor de  $K_D$  mostrado por los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención es inferior a 1  $\mu\text{M}$ . Un valor de  $K_D$  de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  se dice que es característico de una unión no específica de un ácido nucleico a una diana. Tal como lo reconocerán los expertos en la técnica, el valor de  $K_D$  de un grupo de compuestos tal como los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención está dentro de un cierto intervalo. El  $K_D$  antes mencionado de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ , es un límite superior preferido para el valor de  $K_D$ . El límite inferior para el  $K_D$  de los ácidos nucleicos de unión a diana puede ser tan pequeño como de aproximadamente 10 picomolar 40 o puede ser mayor. Esta dentro de la presente invención que los valores de  $K_D$  de los ácidos nucleicos individuales de unión a C5a, estén preferentemente dentro de este intervalo. Los intervalos preferidos pueden ser definidos eligiendo cualquier primer número dentro de este intervalo, y cualquier segundo número dentro de este intervalo. Los valores de  $K_D$  superiores preferidos son 250 nM y 100 nM, los valores de  $K_D$  inferiores preferidos son 50 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM y 10 pM. El valor de  $K_D$  superior más preferido es 10 nM, el valor de  $K_D$  inferior más preferido es 100 pM.

45 Además de las propiedades de unión de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención inhiben la función de la molécula diana respectiva que en el presente caso es C5a. La inhibición de la función de C5a - por ejemplo, la estimulación de los receptores respectivos tal como se describió previamente - se logra uniendo las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención a C5a y formando un complejo de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y C5a. Dicho complejo de una molécula de ácido nucleico y C5a puede no estimular los receptores que 50 normalmente son estimulados por C5a, es decir, C5a que no está presente en un complejo con una molécula de ácido nucleico de la invención. Por consiguiente, la inhibición de la función receptora mediante moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es independiente del receptor respectivo que puede ser estimulado por C5a pero que resulta de la prevención de la estimulación de receptor por C5a a través de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

55 Una posibilidad para determinar la constante de inhibición de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es el uso de los métodos tal como se describe en el ejemplo 5, el cual confirma el descubrimiento anterior de que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención exhiben una constante de inhibición favorable que permite el uso de dichos ácidos nucleicos en un esquema de tratamiento terapéutico. Una medida adecuada con el objeto de expresar la intensidad del efecto inhibidor de la molécula de ácido nucleico individual en la interacción de la diana, la cual en el presente caso es C5a y el receptor respectivo, que es la llamada 60

concentración de inhibición del 50% (abreviadamente IC<sub>50</sub>) la cual, así como el método para su determinación, son conocidos por un experto en la técnica.

Preferentemente, el valor de IC<sub>50</sub> mostrado por las moléculas del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es inferior a 1 μM. Un valor de IC<sub>50</sub> de aproximadamente 1 μM se dice que es característico de una inhibición no específica de funciones diana por una molécula de ácido nucleico. Tal como lo reconocen los expertos en la técnica, el valor de IC<sub>50</sub> de un grupo de compuestos, tal como las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está dentro de cierto intervalo. El IC<sub>50</sub> antes mencionado de aproximadamente 1 μM es un límite superior preferido para el valor de IC<sub>50</sub>. El límite inferior para el IC<sub>50</sub> de las moléculas de ácido nucleico de unión a la diana puede ser tan pequeño como de aproximadamente 10 picomolar o puede ser mayor. Está dentro de la presente invención que los valores de IC<sub>50</sub> de los ácidos nucleicos individuales de unión a C5a esté preferentemente dentro de este intervalo. Los intervalos preferidos pueden ser definidos eligiendo cualquier primer número dentro de este intervalo y cualquier segundo número dentro de este intervalo. Los valores de IC<sub>50</sub> superiores preferidos son 250 nM y 100 nM, los valores de IC<sub>50</sub> inferiores preferidos son 50 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM y 10 pM. El valor de IC<sub>50</sub> superior más preferido es 5 nM, el valor de IC<sub>50</sub> inferior más preferido es 100 pM.

Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención pueden tener cualquier longitud siempre que tengan la capacidad de unirse a la molécula diana. Se reconocerá en la técnica que existen longitudes preferidas de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Normalmente, la longitud es entre 15 y 120 nucleótidos. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquier número entero entre 15 y 120 es una longitud posible para los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Los intervalos más preferidos para la longitud de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención son longitudes de aproximadamente 20 a 100 nucleótidos, aproximadamente 20 a 80 nucleótidos, aproximadamente 20 a 60 nucleótidos, aproximadamente 38 a 44 nucleótidos y aproximadamente 40 nucleótidos.

Está dentro de la presente invención, que la molécula de ácido nucleico de la presente invención comprenda un resto, que sea preferentemente un resto de alto peso molecular y/o que permita preferentemente modificar las características de la molécula de ácido nucleico en términos, entre otros, del tiempo de permanencia en el cuerpo del animal, preferentemente el cuerpo humano. Una realización particularmente preferida de dicha modificación es PEGilación y HESilación de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Tal como se utiliza aquí, PEG representa polietilenglicol) y HES hidroxietil-almidón. La PEGilación tal como se utiliza aquí preferentemente, es la modificación de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, por lo que dicha modificación consiste en un resto de PEG que está unido a una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. La HESilación tal como se utiliza aquí preferentemente es la modificación de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, por lo que dicha modificación consiste en un resto de HES que está unido a una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Estas modificaciones, así como el proceso para modificar una molécula de ácido nucleico utilizando dichas modificaciones, se describe en la solicitud de Patente Europea EP 1306382.

En el caso de que PEG sea dicho resto de alto peso molecular, el peso molecular es preferentemente de aproximadamente 20.000 hasta aproximadamente 120.000 Da, más preferentemente de aproximadamente 30.000 hasta aproximadamente 80.000 Da y lo más preferentemente de aproximadamente 40.000 Da. En el caso de que HES sea dicho resto de alto peso molecular, el peso molecular es preferentemente de aproximadamente 50 kDa hasta aproximadamente 1000 kDa, más preferentemente de aproximadamente 100 kDa hasta aproximadamente 700 kDa y lo más preferentemente desde 200 kDa hasta 500 kDa. HES exhibe una sustitución molar de 0,1 a 1,5, más preferentemente de 1 a 1,5 y exhibe un grado de sustitución expresado como la relación C2/C6 de aproximadamente 0,1 a 15, preferentemente de aproximadamente 3 a 10. El proceso de la modificación con HES, se describe por ejemplo, en la Solicitud de Patente Alemana DE 12004006249.8.

En principio, la modificación puede realizarse en la molécula de ácido nucleico de la presente invención en cualquiera de sus posiciones. Preferentemente, dicha modificación se realiza ya sea en el nucleótido 5'-terminal, el nucleótido 3'-terminal y/o cualquier nucleótido entre el nucleótido 5' y el nucleótido 3' de la molécula de ácido nucleico.

La modificación y preferentemente el resto de PEG y/o HES puede unirse a la molécula de ácido nucleico de la presente invención, ya sea directa o indirectamente, preferentemente indirectamente a través de un enlazador. También está dentro de la presente invención que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprenda una o más modificaciones, preferentemente uno o más restos de PEG y/o HES. En una realización, la molécula de enlazador individual une más de un resto de PEG o resto de HES a una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El enlazador utilizado en relación con la presente invención por sí mismo puede ser lineal o ramificado. Estos tipos de enlazadores son conocidos por los expertos en la técnica y se describen adicionalmente en las solicitudes de patente internacional WO2005/074993 y WO2003/035665.

En una realización preferida, el enlazador es un enlazador biodegradable. El enlazador biodegradable permite modificar las características de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención en términos, entre otros, del tiempo de permanencia en el cuerpo del animal, preferentemente un cuerpo humano, debido a la liberación de la modificación de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El uso del

enlazador biodegradable puede permitir un mejor control del tiempo de permanencia de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Una realización preferida de dicho enlazador biodegradable es el enlazador biodegradable que se describe en, pero sin limitación, en las solicitudes de patente internacional WO2006/052790, WO2008/034122, WO2004/092191 y WO2005/099768.

- 5 Está dentro de la presente invención que la modificación o grupo de modificaciones sea una modificación biodegradable, por lo que la modificación biodegradable se puede unir a la molécula de ácido nucleico de la presente invención ya sea directa o indirectamente, preferentemente a través de un enlazador. La modificación biodegradable permite modificar las características de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención en términos de, entre otros, tiempo de permanencia en el cuerpo del animal, preferentemente en un cuerpo humano, debido a la liberación o degradación de la modificación de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El uso de una modificación biodegradable puede permitir un mejor control del tiempo de permanencia de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Una realización preferida de dicha modificación biodegradable, se describe en, pero sin limitación, en las solicitudes de patente internacional WO2002/065963, WO2003/070823, WO2004/113394 y WO2004/41647, preferentemente en WO2004/41647, página 18, líneas 4 a 24.
- 10 15 Además de las modificaciones descritas anteriormente, se pueden utilizar otras modificaciones para modificar las características de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, por lo que dichas otras modificaciones pueden ser seleccionadas del grupo de proteínas, lípidos, tales como colesterol, y cadenas de azúcar tales como amilasa, dextrano, etc.
- 20 Sin pretender limitarse a teoría alguna, para modificar la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención con un resto de alto peso molecular, tal como un polímero, y más particularmente uno o varios de los polímeros aquí descritos, los cuales son preferentemente fisiológicamente aceptables, se cambia la cinética de excreción de la molécula de ácido nucleico así modificada de la invención procedente del cuerpo del animal o humano al cual se administra la molécula de ácido nucleico modificada de la invención. Más particularmente debido al mayor peso molecular de la molécula de ácido nucleico así modificada de la invención, y debido a que la molécula de ácido nucleico de la invención no se somete a metabolismo, particularmente cuando está en la forma L, es decir, siendo una molécula de ácido L-nucleico, se disminuye la excreción del cuerpo de un animal, preferentemente del cuerpo de un mamífero y más particularmente del cuerpo de un ser humano. Ya que la excreción normalmente ocurre a través de los riñones, los autores de la presente invención suponen que la tasa de filtración glomerular de la molécula de ácido nucleico modificada de esta forma, se reduce significativamente en comparación con una molécula de ácido nucleico que no tiene este tipo de modificación de alto peso molecular que da como resultado un incremento en el tiempo de permanencia de la molécula de ácido nucleico modificada en el cuerpo del animal. En relación con esto, es particularmente notable que, a pesar de dicha modificación de alto peso molecular, la especificidad de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención no se ve afectada en una forma perjudicial. De hecho, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención tiene, entre otras, la característica sorprendente - que normalmente no puede esperarse de un compuesto farmacéuticamente activo - de modo que no se requiere necesariamente una formulación farmacéutica que proporcione una liberación sostenida para proporcionar la liberación sostenida de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Más bien, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención en su forma modificada que comprende un resto de alto peso molecular, puede ya ser utilizada como una formulación de liberación sostenida a medida que actúa, debido a su modificación, si se liberó de la formulación de liberación sostenida. Por lo tanto, la(s) modificación(s) de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención tal como aquí se describe, y por lo tanto la molécula de ácido nucleico así modificada de acuerdo con la presente invención y cualquier composición que la comprende puede proporcionar una farmacocinética distinta preferentemente controlada o una biodistribución de la misma. Esto también incluye un tiempo de permanencia en la circulación del cuerpo de animales y seres humanos, y la distribución a los tejidos en dichos animales y seres humanos. Dichas modificaciones se describen adicionalmente en la solicitud de patente WO2003/035665.
- 25 30 35 40 45

Sin embargo, también está dentro de la presente invención que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención no comprenda ninguna modificación, y particularmente ninguna modificación de alto peso molecular, tal como por PEG o HES. Dicha realización es particularmente preferida cuando la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención muestra una distribución preferencial para cualquier órgano o tejido diana en el cuerpo, o cuando se deseé una eliminación rápida de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención del cuerpo después de la administración. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención tal como aquí se describe, con un perfil de distribución preferencial para cualquier órgano o tejido diana en el cuerpo, permitiría el establecimiento de concentraciones locales efectivas en el tejido diana, manteniendo al mismo tiempo baja la concentración sistémica de la molécula de ácido nucleico. Esto permitiría el uso de bajas dosis que no solamente son beneficiosas desde un punto de vista económico, sino también reducen la exposición innecesaria de otros tejidos a la molécula de ácido nucleico, reduciendo de esta forma el riesgo potencial de efectos secundarios. La eliminación rápida de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención del cuerpo después de la administración puede ser deseada, entre otros casos, en el caso de generación de imágenes *in vivo* o requerimientos de dosificación terapéuticos específicos utilizando la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o medicamentos que la contienen.

Los ácidos nucleicos inventivos, los cuales también se denominan en el presente documento como los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención y/o los antagonistas de acuerdo con la presente invención, puede ser utilizados para la generación o fabricación de un medicamento. Dicho medicamento o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención contiene al menos uno de los ácidos nucleicos inventivos, opcionalmente junto con otros compuestos farmacéuticamente activos, por lo que el ácido nucleico de la invención actúa preferentemente por sí mismo como un compuesto farmacéuticamente activo. Dichos medicamentos comprenden, en realizaciones preferidas, al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo puede ser por ejemplo, agua, tampón, PBS, solución de glucosa, preferentemente una solución equilibrada de sal de glucosa al 5%, almidón, azúcar, gelatina o cualquier otra sustancia vehículo aceptable. Dichos vehículos generalmente son conocidos por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica reconocerán que cualesquier realizaciones, usos y aspectos, o que se relacionan con el medicamento de la presente invención, también se aplican a la composición farmacéutica de la presente invención y vice versa.

Las indicaciones, enfermedades y trastornos para el tratamiento y/o la prevención de dichos ácidos nucleicos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de acuerdo, o que se preparan de acuerdo con la presente invención resultan de la implicación, ya sea directa o indirecta de C5a en el mecanismo patogenético respectivo.

La liberación local de C5a en sitios de inflamación da como resultado potentes estímulos proinflamatorios. Por lo tanto, la neutralización de C5a debe ser beneficiosa en muchas estados crónicos o agudos, tales como enfermedades asociadas al complejo inmunitario, en general (Heller et al., 1999); neurodegeneración e inflamación, por ejemplo enfermedad de Alzheimer (Bonifati & Kishore, 2007), en donde el antagonista del receptor de C5a del complemento PMX205 mejoró los parámetros de comportamiento y una reducción de los marcadores patológicos, tales como depósitos fibrilares y glía activada (Fonseca et al., 2009). Otras enfermedades inflamatorias con implicación de C5a son lupus eritematoso sistémico (Jacob et al., 2010a; Jacob et al., 2010b), asma (Kohl, 2001); daños secundarios de traumatismos (Yao et al., 1998); choque séptico (Huber-Lang et al., 2001); síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS); insuficiencia multiorgánica (MOF); síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS); síndrome intestinal inflamatorio (IBD) (Woodruff et al., 2003); enfermedad renal mediada por el complejo inmunitario (Wang, 2006), por ejemplo como una complicación de lupus eritematoso sistémico (Manderson et al., 2004); infecciones y sus consecuencias (por ejemplo, fuga vascular o pérdida ósea tal como pérdida ósea secundaria a la periodontitis (Breivik et al. 2011)); quemaduras graves (Piccolo et al., 1999); lesión por reperfusión de órganos tales como corazón, bazo, vejiga, páncreas, estómago, pulmón, hígado, riñón, extremidades, cerebro, musculatura esquelético o intestino (Riley et al., 2000) (Gueler et al. 2008; Khan et al. 2011; van der Pals et al., 2010; Zheng et al., 2008) que pueden conducir entre otros a función retardada de injertos (Lewis et al., 2008) o fibrosis y/o remodelado del órgano, por ejemplo, después del infarto de corazón, cerebro o pulmón que conduce a daño secundario; psoriasis (Bergh et al., 1993); miocarditis; esclerosis múltiple (Muller-Ladner et al., 1996); hemoglobinuria nocturna paroxismal (PNH), hemólisis, tromboembolia (Hillmern et al., 2007) y artritis reumatoide (RA) (Woodruff et al., 2002), resección de carcinoma de células renales y activación de osteoclastos que promueven la destrucción de huesos, por ejemplo, que da como resultado osteoartritis o curación retardada. Se ha encontrado la C5a del complemento en cantidades elevadas en drusas en degeneración macular relacionada con la edad y se ha mostrado a una expresión aumentada de VEGF incrementada y a promover la neovascularización coroidal que puede conducir a daño y pérdida de la visión (Nozaki et al., 2006).

También se ha demostrado que la activación del sistema del complemento eleva la susceptibilidad a desarrollar malaria cerebral en un modelo de ratón. El bloqueo de C5a o del receptor de C5a utilizando suero de ratones inmunizados con estas moléculas, confería resistencia a la malaria cerebral. Por consiguiente, el bloqueo del eje C5-C5a puede ser beneficioso para la prevención del desarrollo de malaria, especialmente en malaria cerebral en seres humanos (Patel et al., 2008).

Las enfermedades inflamatorias autoinmunitarias con implicación del complemento han sido revisadas recientemente (Chen et al. 2010). En *Nature Biotechnology* (Ricklin & Lambris, 2007) se publicó una revisión experta sobre posibles terapias dirigidas al complemento ya seguidas. Se publicó una actualización en *Molecular Medicine* in 2011 (Ehrnthal et al., 2011).

Por supuesto, debido a que los ácidos nucleicos de unión a C5a de acuerdo con la presente invención interactúan o se unen a C5a humana, un experto en la técnica comprenderá generalmente que los ácidos nucleicos de unión a C5a de acuerdo con la presente invención pueden ser utilizados fácilmente para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de cualquier enfermedad de seres humanos y animales tal como aquí se describe. En relación con esto, se reconocerá que las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención pueden ser utilizadas para el tratamiento y la prevención de cualesquier enfermedades, trastornos o estados aquí descritos, sin importar el modo de acción que subyace en dicha enfermedad, trastorno y estado.

A continuación y sin pretender limitarse a ninguna teoría, se proporciona la explicación para el uso de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención en relación con las diversas enfermedades, trastornos y estados, haciendo convincente de esta forma la aplicabilidad terapéutica, preventiva y de diagnóstico reivindicada de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Con el objeto de evitar cualquier repetición innecesaria, deberá reconocerse que debido a la implicación del eje C5a – receptor de C5a como se describe en relación con esto, dicho eje puede ser dirigido por las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente

invención, de modo que se logre el efecto terapéutico, preventivo o de diagnóstico reivindicado. Deberá reconocerse en además que las particularidades de las enfermedades, trastornos y estados de los pacientes y cualquier detalle del régimen de tratamiento descrito en relación con esto, puede someterse a las realizaciones preferidas de la presente solicitud.

- 5 Las células supresoras derivadas de mieloide (abreviadamente MDS) fueron observadas originalmente en pacientes con cáncer hace más de 30 años, su papel como saboteadores de la inmunidad antitumoral es lo que se aprecia únicamente en la actualidad. Una población heterogénea de células mieloides normales atrapadas en estadios intermedios de diferenciación, las células MDS, se acumulan en la sangre, nodos linfáticos y en sitios tumorales virtualmente en todos los pacientes con cáncer. En individuos sanos, estas células se diferencian en macrófagos, 10 células dendríticas y neutrófilos, aunque los tumores segregan una gama de factores que interrumpen la diferenciación de las células progenitoras inmunitarias (Ostrand-Rosenberg, 2008). Tal como se muestra para células MSD aisladas de la sangre periférica y los bazo de ratones sanos, las células MDS expresan el receptor de C5a en su superficie hasta un grado similar - una expresión abundante – al de sus homólogos maduros, granulocitos y monocitos. También como en ratones que tienen tumores, las células MDS expresan el receptor de C5a, aunque el 15 nivel de expresión es menor en la superficie de células MSD asociadas a tumores que en las células MSD en la sangre periférica y el bazo. La razón es que el receptor de C5a está internalizado en las células asociadas a tumores, tal como ha mostrado Markiewski et al., un antagonista del receptor de C5a puede bloquear la función del receptor de C5a en la superficie de las células MSD y conducir a un crecimiento detenido del tumor (Markiewski et al., 2008). C5a también actúa como un supresor de las funciones de las células asesinas naturales (células NK) lo cual proporciona una explicación del impacto negativo del complemento sobre la supervivencia de tumores y los 20 trastornos de la función de las NK en pacientes con ciertas enfermedades inmunitarias (Li et al., 2012; Min et al., 2012).

Por consiguiente, la enfermedad y/o trastornos y/o estados morbosos para cuyo tratamiento y/o prevención se puede utilizar el medicamento de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no sin limitación, enfermedades y/o trastornos y/o estados morbosos asociados a tumores.

- 25 En una realización preferida, tumor es el nombre de una inflamación o lesión formada por un crecimiento anormal de células (denominado neoplásico). Un tumor puede ser benigno, premaligno o maligno. Además, un tumor puede ser un tumor sólido, preferentemente carcinoma, sarcoma, osteoma, fibrosarcoma y condrosoma.

Los tumores que particularmente pueden ser tratados por un medicamento o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, son preferentemente los tumores que se seleccionan del grupo que comprende tumores del sistema endocrino, los ojos, el tracto gastrointestinal, el sistema genital, el sistema hematopoyético, (incluyendo tumores mixtos y embrionarios), las glándulas mamarias, el sistema nervioso, sistema respiratorio, el esqueleto, la piel, los tejidos blandos, el sistema del flujo urinario.

30 Preferentemente, estos tumores se seleccionan del grupo que comprende cáncer de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de próstata, osteosarcoma, glioblastoma, melanoma, carcinoma de pulmón de células pequeñas y carcinoma colorrectal.

35 Está dentro de la presente invención que el medicamento y la composición farmacéutica, respectivamente, que contienen un ácido nucleico de acuerdo con la invención puede ser utilizados para el tratamiento en dicha forma.

40 En una realización adicional, el medicamento comprende un agente farmacéuticamente activo adicional para el tratamiento de tumores. Dichos compuestos farmacéuticamente activos adicionales son, entre otros, pero sin limitación, las sustancias activas antineoplásicas conocidas, como agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes antiangiogénicos, agentes inhibidores de la mitosis, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la transducción de señales celulares, hormonas, anticuerpos, conjugados inmunitarios y proteínas de fusión.

45 Otros compuestos farmacéuticamente activos, son entre otros, pero sin limitación, los conocidos bleomicina, inhibidores de timidilato-sintasa, tal como raltitrexed y pemetrexed, enzimas tales como L-asparaginasa, miltefosina y anagrelida, inhibidores de proteasoma tal como bortezomib.

Además, el medicamento de acuerdo con la presente invención, se puede utilizar para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

50 La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (abreviadamente COPD) es una enfermedad de los pulmones que está caracterizada por un bloqueo persistente del flujo de aire desde los pulmones. Es una enfermedad de los pulmones subdiagnosticada, que pone en riesgo la vida e interfiere con la respiración normal, y no es completamente reversible. La COPD incluye unas cuantas enfermedades de los pulmones: las más comunes son bronquitis crónica y enfisema. Mucha gente con COPD tienen ambas de estas enfermedades. El enfisema es un daño a los sacos de aire en las puntas de las vías respiratorias que hace difícil que el cuerpo tome el oxígeno necesario. Durante la bronquitis crónica están irritadas las vías respiratorias, enrojecidas y producen moco muy pegajoso. Las paredes de las vías respiratorias están inflamadas y bloquean parcialmente el aire que pasa a su través.

55 Los neutrófilos son atraídos hacia un gradiente de C5a, liberan radicales superóxidos para matar patógenos y liberan beta-glucuronidasa para hidrolizar los conjugados de glucurónidos complejos en el sitio de inflamación. Sin embargo,

estos mecanismos de defensa valiosos pueden ser dañinos para el cuerpo si los neutrófilos son reclutados en sitios de inflamación libres de patógenos, por ejemplo en sitios con reperfusión después de infarto, ictus o trasplante de órganos o en casos de enfermedad autoinmunitaria, enfermedad de Alzheimer y otras que se describen a continuación.

- 5 A su vez, las concentraciones excesivamente altas de C5a - especialmente si no están elevadas localmente como aparecen durante la septicemia - conducen a una activación sistémica de los neutrófilos (que conduce a daño de órganos) con el agotamiento y la desactivación subsecuentes por medio de la expresión reducida del receptor de C5a en la superficie celular de los neutrófilos. Esto hace al paciente incluso más vulnerable a los patógenos que persisten en su cuerpo (Huber-Lang et al., 2002).
- 10 Un ácido nucleico de unión a C5a que también es inhibidor de los efectos mediados por C5a en su receptor (CD88) (tal como se muestra mediante ensayos de quimiotaxis utilizando células BAF-3 diferenciadas) tiene por consiguiente el potencial de bloquear las consecuencias de la señalización de C5a antes mencionadas, y podría ser beneficioso como parte de un medicamento en un número de enfermedades y estados en los cuales está implicada la señalización anómala de C5a. Uno de los estados es septicemia polimicrobiana. Existe una gran cantidad de 15 bibliografía que recolecta evidencias del papel perjudicial de la señalización de C5a en la septicemia (Ward 2010b). Se encontró que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención mejoran la supervivencia de ratones y parámetros de función de órganos en estudios de ligamiento y punción cecal (CLP). CLP es un modelo bien establecido en roedores para septicemia polimicrobiana. Recientemente, el papel del complemento C5 en septicemia inducida por ligamiento y punción cecal fue investigado en ratones con deficiencia de C5 y de tipo natural (WT) (Flierl et al., 2008). Los ratones C5 -/- no tuvieron ventaja de supervivencia en comparación con ratones WT y mostraron 20 un incremento de 400 veces de las bacterias llevadas en la sangre cuando se compararon con ratones de tipo natural. Estos efectos estuvieron asociados a la incapacidad de los ratones C5 (-/-) de ensamblar el complejo de ataque a membrana terminal (MAC). Los autores concluyen que durante la septicemia, el bloqueo selectivo de C5a o su receptor (en lugar de C5) parece una estrategia más prometedora debido a que el bloqueo C5a aún permite la 25 formación de MAC en tanto que se evitan los efectos adversos de C5a. De acuerdo con esto, la delección genética de los receptores de C5a, CD88 y C5L2, el bloqueo farmacológico de CD88 o la neutralización farmacológica de C5a ha mostrado ser protectora en septicemia inducida por ligamiento y punción cecal (CLP) (Czermak et al., 1999; Rittirsch et al., 2008). Una traducción en el modelo *in vitro* de septicemia meningocócica utilizando sangre completa humana, 30 confirma que la inhibición selectiva de C5a (en contraste con el bloqueo de escisión de C5) evita potencialmente la activación perjudicial de leucocitos sin comprender la eliminación bacteriana (Sprong et al., 2003). La inhibición de C5a evita la insuficiencia multiorgánica en la septicemia experimental limitando la inflamación sistémica, coagulación y otros mecanismos patógenos (Huber-Lang et al., 2001; Huber-Lang et al., 2002; Laudes et al., 2002; Rittirsch et al., 2008; Ward 2010a). Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, aunque se unan a C5 no bloquean 35 la escisión de C5 en C5a y C5b que es requerida para la formación de MAC. Por el contrario, los ácidos nucleicos de la invención ocupan la proteína C5, la cual también incrementa la semivida en plasma terminal y bloquean selectivamente la acción de C5a una vez que esta ha sido liberada, por ejemplo, por la C5 convertasa. En un modelo de septicemia, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención han mostrado limitar la inflamación, prevenir la insuficiencia multiorgánica y la formación de edema y mejorar la supervivencia.
- 40 Los pacientes con septicemia requieren con frecuencia ventilación mecánica debido a una lesión pulmonar aguda (ALI) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS). ALI/ARDS se puede desarrollar también a partir de una infección directa del pulmón por infecciones adquiridas en la comunidad u hospital en neumonía. Existe abundante evidencia de un papel patogénico de C5a en ALI/ARDS. La expresión de factor tisular inducida por C5a contribuye a la deposición de fibrina dentro de los alveolos pulmonares de pacientes con ALI ARDS (Kambas et al., 2008). La ALI experimental está atenuada en ratones con C5-/- y la neutralización de C5a o el silenciamiento de C5aR en los pulmones suprime la respuesta inflamatoria y evita la fuga vascular (Bosmann & Ward 2012).
- 45 Además, otra enfermedad y/o trastornos y/o estados morbosos para el tratamiento y/o la prevención para los cuales se puede utilizar el medicamento de acuerdo con la presente invención, incluyen pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide (abreviadamente RA), espondilitis anquilosante (abreviadamente AS), lupus eritematoso sistémico (abreviadamente SLE), esclerosis múltiple (abreviadamente MS), psoriasis, alopecia areata, anemia hemolítica autoinmunitaria caliente y fría (abreviadamente AIHA), uremia hemolítica atípica, anemia perniciosa, enfermedades inflamatorias agudas, adrenalitis autoinmunitaria, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (abreviadamente CIDP), síndrome de Churg-Strauss, síndrome de Cogan, síndrome de CREST, pénfigo vulgaris y pénfigo folláceo, pénfigo ampolloso, polimialgia reumática, polimiositis, cirrosis biliar primaria, pancreatitis, peritonitis, artritis psoriásica, fiebre reumática, sarcoidosis, síndrome de Sjögren, escleroderma, enfermedad celiaca, síndrome de persona rígida, arteritis de Takayasu, intolerancia temporal al gluten, uveítis autoinmunitaria, vitílico, policondritis, dermatitis herpetiforme (abreviadamente DH) o enfermedad de Duhring, fibromialgia, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad intestinal inflamatoria (abreviadamente IBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, miastenia grave, 50 trastornos del complejo inmunitario, glomerulonefritis, poliarteritis nodosa, síndrome anti-fosfolípidos, síndrome autoinmunitario poliglandular, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (abreviadamente ITP), urticaria, infertilidad autoinmunitaria, artritis reumatoide juvenil, sarcoidosis, cardiomiopatía autoinmunitaria, 55 síndrome de Lambert-Eaton, esclerosis de liquen, enfermedad de Lyme, enfermedad de Graves, enfermedad de Behcet, enfermedad de Ménière, artritis reactiva (síndrome de Reiter); infecciones por virus tales como HIV, HBV,

HCV, CMV, o parásitos intracelulares, tales como *Leishmania*, *Rickettsia*, *Chlamidia*, *Coxiella*, *Plasmodium*, *Brucella*, micobacterias, *Listeria*, *Toxoplasma* y *Tripanosoma*; daños secundarios de traumatismos; inflamación local, choque, choque anafiláctico, quemadura, choque séptico, choque hemorrágico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (abreviadamente SIRS), insuficiencia multiorgánica (abreviadamente MOF), asma y alergia, vasculitidas, tales como arteritis temporales, vasculitis, fuga vascular, y ateroesclerosis; lesiones agudas del sistema nervioso central, miocarditis, dermatomiositis, gingivitis, insuficiencia respiratoria aguda, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, ictus, infarto al miocardio, lesión por reperfusión, disfunción neurocognitiva, quemadura, enfermedad inflamatoria de los ojos, tales como uveítis, degeneración macular relacionada con la edad (abreviadamente AMD), retinopatía diabética (abreviadamente DR), edema macular diabético (abreviadamente DME), pénfigo ocular, queratoconjuntivitis, síndrome de Stevens-Johnson, y oftalmopatía de Graves; manifestaciones locales de enfermedades sistémicas, enfermedad inflamatoria de la vasculatura, lesiones agudas del sistema nervioso central, diabetes tipo 1 y 2, manifestaciones de diabetes, SLE, y enfermedad reumática en los ojos, cerebro, vasculatura, corazón, pulmón, riñones, hígado, tracto gastrointestinal, bazo, piel, huesos, sistema linfático, sangre u otros sistemas de órganos, para la prevención y/o soporte y/o tratamiento post-operatorio de injerto de bypass de arteria coronaria (abreviadamente CABG), injerto de bypass de arteria coronaria sin bomba (abreviadamente OPCABG), injerto de bypass de arteria coronaria directa mínimamente invasiva (abreviadamente MIDCAB), angioplastia coronaria transluminal percutánea (abreviadamente PTCA), trombolisis, trasplante de órganos y cirugía de fijación de vasos; para la prevención de lesión de órganos de un órgano transplantado, o de un órgano que será transplantado o para uso en el tratamiento del rechazo de trasplante para órganos transplantados, tales como hígado, riñón, intestino, pulmón, corazón, piel, extremidades, córnea, isletas de Langerhans, médula ósea, vasos sanguíneos y páncreas; rechazo fetal.

Las diversas enfermedades y trastornos para cuyo tratamiento y/o prevención se pueden utilizar los ácidos nucleicos, se pueden agrupar como se indican a continuación:

#### 1. Enfermedades autoinmunitaria/inflamatorias

- 25        1.1 Enfermedades autoinmunitaria y/o inflamatorias sistémicas que comprenden alergia, choque séptico, daños secundarios de traumatismos, anemia hemolítica autoinmunitaria caliente y fría (abreviadamente AIHA), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (abreviadamente SIRS), choque hemorrágico, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, las manifestaciones de diabetes, escleroderma difusa, periodontitis y su pérdida ósea asociada, policondritis, síndrome autoinmunitario poliglandular, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (abreviadamente SLE) y sus manifestaciones, artritis reactiva (también conocida como síndrome de Reiter).
- 30        1.2 Enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias del tracto gastrointestinal que comprenden enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celiaca, intolerancia temporal al gluten, enfermedad intestinal inflamatoria (abreviadamente IBD), pancreatitis, hipersensibilidad alérgica gastrointestinal, enterocolitis necrotizante.
- 35        1.3 Enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias de la piel que comprenden psoriasis, urticaria, dermatomiositis, pénfigo vulgaris, pénfigo foliáceo, penfigoide ampolloso, escleroderma morfea/lineal, vitíligo, dermatitis herpetiforme (abreviadamente DH) o enfermedad de Duhring, esclerosis de liquen.
- 40        1.4 Enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias de la vasculatura que comprende vasculitidas (preferentemente arteritis temporales), vasculitis, púrpura de Henoch Schölein, vasculitis asociada a anticuerpos citoplásmicos anti-neutrofilos (ANCA), fuga vascular, polimialgia reumática, ateroesclerosis, síndrome de Churg-Strauss, arteritis de Takayasu, síndrome de Goodpasture (= enfermedad de membranas basales antiglomerular; en su mayoría afecta a los riñones glomerulares y los pulmones), glomerulonefritis, poliarteritis nodosa, enfermedad de Behçet.
- 45        1.5 Enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias del sistema nervioso que comprenden esclerosis múltiple (abreviadamente MS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (abreviadamente CIDP), disfunción neurocognitiva, síndrome de persona rígida, síndrome de Guillain-Barré, miastenia grave, síndrome de Lambert-Eaton, neuromielitis óptica (síndrome de Devic).
- 50        1.6 Enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias de la musculatura del esquelético que comprenden artritis reumatoide, enfermedad reumática de los ojos, cerebro, pulmón, riñón, corazón, hígado, tracto gastrointestinal, bazo, piel, hueso, sistema linfático, sangre u otros órganos, espondilitis anquilosante (abreviadamente AS), sarcoidosis, periodontitis y pérdida ósea asociada, polimialgia reumática, polimiositis, artritis psoriásica, fiebre reumática, policondritis, fibromialgia, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Lyme, artritis reactiva (también conocida como síndrome de Reiter).
- 55        1.7 Otras enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias comprenden síndrome de Cogan, adrenalitis autoinmunitaria, trastornos del complejo inmunitario, enfermedad de Ménière, inflamaciones locales, alopecia areata, enfermedades inflamatorias agudas, cirrosis biliar primaria, síndrome de Sjögren, escleroderma, escleroderma difusa, síndrome de CREST, escleroderma morfa/lineal, uveítis autoinmunitaria, tiroiditis de

- Hashimoto (destrucción autoinmunitaria del tiroides), enfermedad de Graves, hepatitis autoinmunitaria, esteatohepatitis no alcohólica, glomerulonefritis, peritonitis, síndrome anti-fosfolípidos, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis renal, fibrosis hepática, infertilidad autoinmunitaria, rechazo fetal o aborto y enfermedad del hospedante frente al injerto.
- 5        2. Enfermedades de los ojos que comprenden uveítis, conjuntivitis, degeneración macular relacionada con la edad (abreviadamente AMD), retinopatía diabética (abreviadamente DR), edema macular diabético (abreviadamente DME), oclusión de vasos retinales, glaucoma, cataratas, enfermedad inflamatoria retinal e intraocular autoinmunitaria, pénfigo ocular, queratoconjuntivitis, síndrome de Stevens-Johnson y oftalmopatía de Graves.
- 10      3. Lesiones por reperfusión y rechazos de trasplantes que comprenden ictus, infarto de miocardio, lesiones por reperfusión, microangiopatía trombótica postrasplante o daños a órganos trasplantados tales como hígado (Arumugam et al., 2004), riñón (Arumugam et al., 2003), intestino, pulmón, corazón, piel, extremidad, córnea, islotes de Langerhans (Tokodai et al., 2010), médula ósea, vasos sanguíneos y páncreas, daño del riñón después de trasplante de órganos o de médula ósea.
- 15      4. Prevención de rechazo de trasplante que comprende rechazo de trasplante de órganos trasplantados, tales como hígado, riñón, intestino, pulmón, corazón, piel, extremidad, córnea, islotes de Langerhans, médula ósea, vasos sanguíneos y páncreas.
- 20      5. Enfermedades cardiovasculares que comprenden ateroesclerosis, miocarditis, infarto de miocardio, ictus, hipertensión arterial pulmonar (PAH), aneurisma aórtico abdominal, enfermedades inflamatorias de la vasculatura, vasculitidas, preferentemente arteritis temporales, vasculitis, fuga vascular, las manifestaciones de diabetes, pre-eclampsia, cardiomiopatía autoinmunitaria, enfermedad del hospedante venoso, displasia ventricular derecha/cardiomiopatía arritmogénica, para la prevención y/o el soporte y/o el tratamiento postoperatorio de injerto de bypass de arteria coronaria (abreviadamente CABG).
- 25      6. Una disfunción metabólica que comprende resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa, inflamación adiposa y disfunción cardiovascular en obesidad inducida por la dieta.
7. Enfermedades respiratorias que comprenden asma, insuficiencia respiratoria aguda, lesión de pulmón aguda, lesión de pulmón relacionada con transfusión, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de pulmón inducida por ventilador, neumonía y sus complicaciones.
- 30      8. Enfermedades inflamatorias que comprenden enfermedad inflamatoria de los ojos, uveítis autoinmunitaria (Copland et al., 2010), conjuntivitis, conjuntivitis vernal, manifestaciones locales de enfermedades sistémicas.
9. Reacciones agudas que comprenden daños secundarios de traumatismos y fracturas, choque, quemadura, choque anafiláctico, choque hemorrágico, insuficiencia multiorgánica (abreviadamente MOF), lesiones agudas del sistema nervioso central, daño agudo debido a la producción excesiva de C5a por un sistema de coagulación activado tal como trasplante de órganos o islotes.
- 35      10. Dolor, dolor agudo, dolor crónico, dolor neuropático, tolerancia a la morfina e hiperalgesia inducida por abstinencia.
11. Trastornos neurológicos y neurodegenerativos que comprenden neuropatías, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (Farkas et al., 1998).
12. Enfermedades infecciosas que comprenden:
- 40      12.1 Infecciones bacterianas, preferentemente meningitis, enfermedad de Lyme, artritis reactiva (también conocida como síndrome de Reiter), infección de riñón y tracto urinario, septicemia y sus complicaciones tales como insuficiencia orgánica, disfunción cardíaca, hipoperfusión sistémica, acidosis, síndrome de enfermedad respiratoria en adultos, infecciones con patógenos intracelulares (Klos et al., 2009),
- 12.2 infecciones virales, preferentemente por HIV, HBV, HCV, CMV, meningitis viral.
- 45      12.3 parásitos intracelulares, preferentemente *Leishmania*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Plasmodium*, especialmente malaria cerebral, *Brucella*, micobacterias, *Listeria*, *Toxoplasma* y *Trypanosoma*.
- 50      13. Enfermedades hematológicas que comprenden enfermedades asociadas con la activación de la coagulación y coagulación intravascular diseminada (DIC) por sistemas fibrinolíticos, y/o trombosis, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoinmunitaria caliente y fría (abreviadamente AIHA), síndrome anti-fosfolípidos y sus complicaciones asociadas, trombosis arterial y venosa, complicaciones del embarazo tales como abortos recurrentes y muerte fetal, pre-eclampsia, insuficiencia de placenta, restricción de crecimiento fetal, remodelado cervical y nacimiento prematuro, púrpura trombocitopénica idiopática (abreviadamente ITP), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), hemoglobinuria nocturna paroxismal (PNH) y reacciones alérgicas a transfusiones.

14. Complicaciones clínicas asociadas con la activación por biomateriales de las cascadas del complemento y coagulación que ocurren en procedimientos que comprenden hemodiálisis, aféresis, visco-suplementación de articulaciones artríticas, bypass cardiopulmonar, injertos vasculares protésicos y el uso de dispositivos cardiovasculares.

- 5 Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención también se pueden utilizar en una forma intra-operativa para evitar los efectos perjudiciales del sistema inmunitario del paciente, más preferentemente para la prevención y/o el soporte y/o el tratamiento postoperatorio de injerto de bypass de arteria coronaria (abreviadamente CABG), injerto de derivación de arteria coronaria sin bomba (abreviadamente OPCABG), injerto de bypass de arteria coronaria directo mínimamente invasivo (abreviadamente MIDCAB), angioplastia coronaria transluminal percutánea (abreviadamente PTCA), trombolisis, trasplante de órganos, cirugía de cerebro y médula espinal, cirugía reconstructiva y cirugía de fijación de vasos, durante cualquier tratamiento con ventilación artificial o ventilación asistida para evitar lesiones de pulmón inducidas por ventilador de pulmón o daños secundarios, tal como fuga vascular y/o enfisema, para la prevención de daño a órganos de un órgano transplantado o de un órgano que será transplantado o para uso en el tratamiento de rechazo de trasplante y lesión por reperfusión de órganos transplantados, tales como hígado, riñón, intestino, pulmón, corazón, piel, extremidad, córnea, islotes de Langerhans, médula ósea, vasos sanguíneos y páncreas.

Está dentro de la presente invención, que el medicamento y la composición farmacéutica, respectivamente que contienen un ácido nucleico de acuerdo con los autores de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento en esta forma.

- 20 En una realización adicional, el medicamento comprende un agente farmacéuticamente activo adicional. Dichos compuestos farmacéuticamente activos adicionales son, entre otros, pero limitación, los conocidos para suprimir el sistema inmunitario tal como inhibidores de calcineurina, ciclosporina A, metotrexato, azatioprina, tacrolimus, rapamicina, clorambucilo, leflunomida, micofenolato de mofetilo, brequinar, mizoribina, talidomida o desoxiespergualina. El compuesto farmacéuticamente activo adicional puede ser, en una realización adicional, 25 también uno de los compuestos que reducen la producción de histamina, tales como meclozina, clemastina, dimetindeno, bamipina, ketotifeno, cetirizina, lovecetirizina, cesloratadina, azelastina, mizolastina, levocabastina, terfenadina, fexofenadina o ebastina. Dichos compuestos también pueden ser, pero limitación, esteroides, y se seleccionan preferentemente del grupo que contiene corticosteroides como prednisona, metilprednisolona, hidrocortisona, dexametasona, triamcinolona, betametasona, efervescente, o budesonida. Además, dicho compuesto 30 puede ser uno o varios antibióticos, tales como pero sin limitación, aminoglicósidos, antibióticos de β-lactama, inhibidores de girasa, antibióticos glicopeptídicos, lincosamida, antibióticos macrólidos, derivados de nitroimidazol, antibióticos polipeptídicos, sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina. Además, se pueden utilizar productos biológicos antiinflamatorios o antiangiogénicos más específicos en combinación, tales como bevacizumab, ranibizumab, IL-10, erlizumab, tolermab, rituximab, gomiliximab, basiliximab, daclizumab, HuMax-TAC, visilizumab, HuMaxCD4, 35 clenoliximab, MAX 16H5, TNX 100, toralizumab, alemtuzumab, CY 1788, galiximab, pexelizumab, eculizumab, PMX-53, ETI 104, FG 3019, bertilimumab, 249417 (anti-factor IX) abciximab, YM 337, omalizumab, talizumab, fontolizumab, J695 (anti-IL12), HuMaxIL-15, mepolizumab, elsilimomab, HuDREG, anakinra, Xoma-052, adalimumab, infliximab, certolizumab, afelimomab, CytoFab, AME 527, vapaliximab, bevacizumab, ranibizumab, 40 vitaxina, belimumab, MLN 1202, volociximab, F200 (anti-α5β1), efalizumab, m60.11 (anti-CD11b), etanercept, onercept, rilonacept, abatacept, natalizumab, o siplizumab, tocilizumab, ustekinumab, ABT-874. Finalmente, el agente farmacéuticamente activo adicional puede ser un modulador de la actividad de cualquiera otra quimiocina que pueda ser un agonista o antagonista de quimiocina o un agonista o antagonista del receptor de quimiocina por lo 45 cual la quimiocina también puede ser un lípido quimiotáctico. Un ejemplo es el modulador del receptor SIP fingolimod. Alternativa o adicionalmente, dicho agente farmacéuticamente activo adicional es un ácido nucleico adicional de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, el medicamento comprende al menos uno o ácido nucleico Más que se une a una molécula diana diferente de C5a o exhibe una función que es diferente a la de uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención.

En general, el antagonista de C5a puede ser combinado con inhibidores de otras moléculas proinflamatorias o sus receptores. Los ejemplos de moléculas proinflamatorias cuya acción puede ser atenuada en combinación con el antagonista de C5a, son IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-23, TNF, α4β7, α5β1, BlyS, caderina, CCR2, CD11a, CD11b, CD125, CD130, CD16, CD18, CD2, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, 50 CD3, CD30, CD4, CD40, CD40L, CD44, CD45R, CD54, CD62E, CD62L, CD68, CD8, CD80, CD86, CD95, CEP, gastrina-R, C1, C1-esterasa, C5, factor D, MBL, receptor 1 del complemento, receptor de CTRH2, CTGF, E- y P-selectina, ectaxina, factor IX, FGF-20, Fgl-2, GM-CSF, receptor de GP IIb/IIIa, HMG1, ICAM-1, IgE, timocitos, IFNr, 55 IP-10, MCP-1, receptor de M-CSF, MIF, MMP9, PDGF-D, SDF-1, TGFβ1, factor tisular, receptor de tirosina-quinasa, VAP-1, VCAM-1, VEGF, VLA1, factor de von Willebrandt, fosfato de esfingosina-1, fosfato de ceramida-1 e inhibidores de mitógenos, por ejemplo, inhibidores de ácido lisofosfatídico.

Finalmente, el agente farmacéuticamente activo adicional puede ser un modulador de la actividad de cualquier otra quimiocina que puede ser un agonista o antagonista de quimiocina o un agonista o antagonista del receptor de quimiocina. Alternativa o adicionalmente, dicho agente farmacéuticamente activo adicional es un ácido nucleico adicional de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, el medicamento comprende al menos un ácido

nucleico que se une a una molécula diana diferente de C5a o exhibe una función que es diferente a la de uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención.

Está dentro de la presente invención que el medicamento sea utilizado alternativa o adicionalmente, en principio, para la prevención de cualquiera de las enfermedades descritas en relación con el uso del medicamento para el tratamiento de dichas enfermedades. Por consiguiente, los marcadores respectivos, es decir, para las enfermedades respectivas, son conocidos por los expertos en la técnica. Preferentemente, el marcador respectivo es C5a.

En una realización del medicamento de la presente invención, dicho medicamento es para uso en combinación con otros tratamientos para cualquiera de las enfermedades aquí descritas, particularmente aquellas para las cuales será utilizado el medicamento de la presente invención.

La "terapia de combinación" (o "co-terapia") incluye la administración de un medicamento de la invención y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar el efecto beneficioso de la co-acción de estos agentes terapéuticos, es decir, el medicamento de la presente invención y dicho segundo agente. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero sin limitación, la co-acción farmacocinética o farmacodinámica que resulte de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación normalmente se lleva a cabo durante un período de tiempo definido (normalmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada).

La "terapia de combinación" puede estar destinada, aunque no generalmente para comprender la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia separados que dan como resultado incidental y arbitrariamente las combinaciones de la presente invención. La "terapia de combinación" pretende abarcar la administración de estos agentes terapéuticos en una forma secuencial, esto es, en donde cada agente terapéutico se administra en un diferente momento, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos en una forma sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea se puede realizar por ejemplo administrando a un sujeto una sola cápsula que tenga una relación fija de cada agente terapéutico o en múltiples cápsulas individuales para cada uno de los agentes terapéuticos.

La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico puede efectuarse por cualquier vía adecuada que incluye, pero sin limitación, vías tópicas, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares, y absorción directa a través de tejido de la membrana mucosa. Los agentes terapéuticos se pueden administrar la misma vía o por diferentes vías. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada se puede administrar por inyección, en tanto que los otros agentes terapéuticos de la combinación se pueden administrar de forma tópica.

Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos se pueden administrar de forma tópica o todos los agentes terapéuticos se pueden administrar por inyección. La secuencia en la cual se administran los agentes terapéuticos no es muy crítica, a menos que se indique lo contrario. El término "terapia de combinación" también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos, tal como se describió anteriormente en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos. Cuando la terapia de combinación comprende además un tratamiento sin fármacos, el tratamiento sin fármaco puede llevarse a cabo en cualquier momento adecuado siempre que se logre un efecto beneficioso de la co-acción de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento sin fármaco. Por ejemplo, en casos adecuados, el efecto beneficioso incluso se logrará cuando el tratamiento sin fármacos se elimina temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, posiblemente durante días o incluso semanas.

Tal como señala en términos generales anteriormente, el medicamento de acuerdo con la presente invención, se puede administrar en principio, en cualquier forma conocida por los expertos en la técnica. Una vía de administración preferida es la administración sistémica, más preferentemente por administración parenteral, preferentemente por inyección. Alternativamente el medicamento se puede administrar en forma local. Otras vías de administración comprenden intramuscular, intraperitoneal, y subcutánea, *per os*, intranasal, intratecal o pulmonar dando preferencia a la vía de administración que sea la menos invasiva, y al mismo tiempo asegure la eficacia.

La administración parenteral generalmente se utiliza para inyecciones subcutáneas, intramusculares o intravenosas e infusiones. Además, un método para administración parenteral emplea el implante de sistemas de liberación sostenida o liberación lenta, que asegura que se mantenga un nivel constante de dosificación, las cuales son conocidas por los expertos en la técnica.

Además, los medicamentos preferidos de la presente invención se pueden administrar de forma intranasal por uso tópico de vehículos intranasales, inhalantes o por vías transdérmicas adecuados utilizando las formas de parches cutáneos transdérmicos bien conocidos para los expertos en la técnica. Se administrarán en forma de un sistema de suministro transdérmico, en donde por supuesto, la dosificación será continua en lugar de intermitente a lo largo del régimen de dosificación. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, pomadas, lociones, pulverizaciones en aerosol y geles, en donde la concentración de ingrediente activo normalmente puede fluctuar de 0,01% a 15%, p/p o p/v.

El medicamento de la presente invención generalmente comprenderá una cantidad eficaz del (de los) componente(s) activo(s) de la terapia, incluyendo sin limitación una molécula de ácido nucleico de la presente invención, disuelta o dispersa en un medio farmacéuticamente aceptable. Los medios o vehículos farmacéuticamente aceptable incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. También se pueden incorporar ingredientes activos suplementarios en el medicamento de la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica comprende al menos uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención y preferentemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo puede ser cualquier vehículo o cualquier aglutinante utilizado y/o conocido en la técnica. Mas particularmente, dicho aglutinante o vehículo es cualquier aglutinante o vehículo tal como se describe en relación con la fabricación del medicamento aquí descrito. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende un agente farmacéuticamente activo adicional.

La preparación de un medicamento y una composición farmacéutica será bien conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Normalmente, dichas composiciones se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones, líquidas; formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquidos antes de inyección; como comprimidos u otros sólidos para administración oral; como cápsulas de liberación en el tiempo; o en cualquier otra forma normalmente utilizada, incluyendo gotas para los ojos, cremas, lociones, bálsamos, inhalantes, y similares. El uso de formulaciones estériles, tales como lavados a base de solución salina, por parte de cirujanos, médicos o cuidadores sanitarios para tratar una zona particular en el campo de operación, también puede ser particularmente útil. Las composiciones también se pueden suministrar un microdispositivo, micropartículas o esponja.

Tras la formulación, se administrará un medicamento en una forma compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad en la que sea farmacológicamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, aunque también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Dentro de este contexto, la cantidad de ingrediente activo y volumen de la composición que será administrada depende del individuo o el sujeto que será tratado. Las cantidades específicas del compuesto activo requeridas para la administración dependen del criterio del profesional sanitario y son peculiares para cada individuo.

Se utiliza normalmente un volumen mínimo de un medicamento requerido para dispersar los compuestos activos. Los regímenes adecuados para administración también son variables, aunque podrían ser tipificados administrando inicialmente el compuesto y monitorizando los resultados y posteriormente proporcionando dosis controladas adicionales en intervalos adicionales.

Por ejemplo, para la administración oral en la forma de un comprimido o cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina) el componente de fármaco activo, es decir, una molécula de ácido nucleico de la presente invención y/o cualquier agente farmacéuticamente activo adicional, también denominado en la presente invención como agente(s) terapéutico(s) o compuesto(s) activo(s), se puede combinar con un vehículo inerte oral no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desea o es necesario, también se pueden incorporar en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes utilizados en estas formas farmacéuticas incluyen oleato de sodio, esteárico de sodio, esteárico de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol, y similares. Los disgregantes incluyen sin limitación almidón, metilcelulosa, agar-agar, bentonita, almidones de goma de xantano, agar-agar, ácido algínico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes y similares. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

El medicamento de la invención también se puede administrar en dichas formas farmacéuticas orales como comprimidos o cápsulas de liberación programada y liberación prolongada o cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, elíxires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones. Los supositorios se preparan convenientemente a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

La composición farmacéutica o medicamento puede estar esterilizada y/o contener adyuvantes tales como agentes de conservación, estabilización, humectación, emulsificación, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también puede contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan de acuerdo con métodos convencionales de mezclamiento, granulación o recubrimiento y normalmente contienen de aproximadamente 0,1% hasta 75%, preferentemente de aproximadamente 1% a 50%, del ingrediente activo.

Las composiciones líquidas, particularmente inyectables, pueden ser preparadas por ejemplo por disolución, dispersión, etc. El compuesto activo se disuelve o se mezcla con un disolvente farmacéuticamente puro tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar de esta manera la solución o suspensión inyectable. Además, se pueden formular formas sólidas adecuadas para disolverse en líquidos antes de la inyección.

Para composiciones sólidas, los excipientes incluyen calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. El compuesto activo definido anteriormente también puede ser formulado como supositorios, utilizando por ejemplo polialquilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol, tal como el vehículo. En algunas realizaciones, los supositorios se preparan convenientemente a partir de emulsiones y suspensiones.

Los medicamentos y moléculas de ácido nucleico, respectivamente de la presente invención también se pueden administrar en la forma de sistemas de suministro por liposomas tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar a partir de una variedad de fosfolípidos que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, se hidrata una película de componentes lipídicos con una solución acuosa del fármaco para formar una capa lipídica que encapsula el fármaco, que es bien conocida para los expertos en la técnica. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico aquí descritas pueden ser proporcionadas como un complejo con un compuesto lipófilo o no inmunógeno, un compuesto de alto peso molecular construido utilizando métodos conocidos en la técnica. Además, los liposomas pueden llevar dichas moléculas de ácido nucleico en su superficie para dirigir y transportar internamente agentes citotóxicos para mediar la extermación celular. Un ejemplo de complejos asociados con ácido nucleico se proporciona en la patente de EE.UU. N° 6.011.020.

Los medicamentos y moléculas de ácido nucleico, respectivamente, de la presente invención también pueden acoplarse con polímeros solubles como vehículos de fármacos dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polihidroxietilaspanamidafenol o polí(óxido de etileno)polilisina sustituidos con residuos de palmitoilo. Además, los medicamentos y moléculas de ácido nucleico, respectivamente, de la presente invención se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo ácido poliláctico, poliépsilon-caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrílatos y copolímeros de hidrogeles de bloques anfipáticos o reticulados.

Si se desea, la composición farmacéutica y el medicamento, respectivamente, que se han de administrar también contienen cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsificantes, agentes tamponadores del pH y otras sustancias, tales como por ejemplo, acetato de sodio y oleato de trietanolamina.

El régimen de dosificación que utiliza las moléculas de ácido nucleico y medicamentos, respectivamente, de la presente invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen: tipo, especie, edad, peso, sexo y estado médico del paciente; la gravedad del estado que se ha de tratar, la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el aptámero particular o su sal empleada. Un médico o veterinario experto en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del fármaco requerida para prevenir, contrarrestar o detener el progreso del estado.

Los niveles en plasma eficaces del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención fluctúan preferentemente de 500 fM a 500 µM en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades aquí descritas.

Las moléculas de ácido nucleico y medicamentos, respectivamente, de la presente invención pueden ser administrados preferentemente en una sola dosis diaria, cada dos o tres días, semanalmente, cada dos semanas o una sola dosis mensual o cada tres meses.

Esta dentro de presente invención que el medicamento tal como aquí se describe constituya la composición farmacéutica aquí descrita.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para tratamiento de un sujeto que necesita de dicho tratamiento en donde el método comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de al menos uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. En una realización, el sujeto padece de una enfermedad o está en riesgo de desarrollar dicha enfermedad, por lo que la enfermedad es cualquiera de las aquí descritas, particularmente cualquiera de las enfermedades descritas en relación con el uso de cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención para la fabricación de un medicamento.

Ha de entenderse que el ácido nucleico, así como los antagonistas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar no únicamente como un medicamento o para la fabricación de un medicamento, sino también para fines cosméticos, particularmente con respecto a la implicación de C5a en lesiones de la piel regionales inflamadas. Por consiguiente, una estado o enfermedad adicional para cuyo tratamiento o prevención se puede utilizar el ácido nucleico, el medicamento y/o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, son lesiones de piel regionales inflamadas.

Tal como se utiliza preferentemente en la presente invención, un diagnóstico o agente de diagnóstico o medio de diagnóstico es adecuado para detectar, ya sea directa o indirectamente C5a, preferentemente C5a tal como aquí se describe y más preferentemente C5a tal como aquí se describe en relación con los diversos trastornos y enfermedades aquí descritos. El diagnóstico es adecuado para la detección y/o seguimiento de cualquiera de los

5 trastornos y enfermedades, respectivamente, aquí descritos. Dicha detección es posible a través de la unión de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención a C5a. Dicha unión puede ser detectada ya sea directa o indirectamente. Los métodos y medios respectivos son conocidos por los expertos en la técnica. Entre otros, los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención pueden comprender una etiqueta que permite la detección de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, preferentemente el ácido nucleico unido a C5a. Dicha  
10 etiqueta se selecciona preferentemente del grupo que comprende etiquetas radioactivas, enzimáticas y fluorescentes. En principio, todos los ensayos conocidos desarrollados para anticuerpos pueden ser adoptados para los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, siempre que el anticuerpo de unión a la diana se substituya por un ácido nucleico de unión a la diana. En ensayos con anticuerpo que utilizan anticuerpos de unión a la diana no etiquetados, la detección se lleva a cabo preferentemente a través de un anticuerpo secundario que está  
15 modificado con etiquetas radioactivas, enzimáticas y fluorescentes, y se unen al anticuerpo de unión a la diana en su fragmento Fc. En el caso de un ácido nucleico, preferentemente un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico está modificado con una etiqueta, por lo cual dicha etiqueta se selecciona preferentemente del grupo que comprende biotina, Cy-3 y Cy-5, y dicha etiqueta es detectada por un anticuerpo dirigido contra dicha etiqueta, por ejemplo un anticuerpo anti-biotina, un anticuerpo anti-Cy3 o un anticuerpo anti-  
20 Cy5, o – en el caso que la etiqueta sea biotina – la etiqueta es detectada por estreptavidina o avidina que se unen de forma natural a biotina. Dicho anticuerpo, la estreptavidina o la avidina, son modificados preferentemente con un marcador respectivo, por ejemplo, un marcador radioactivo, enzimático o fluorescente (como un anticuerpo secundario).

25 En una realización adicional las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, son detectadas o analizadas por un segundo medio de detección, en donde dicho medio de detección es una baliza molecular. La metodología de la baliza molecular es conocida por los expertos en la técnica. En síntesis, las sondas de ácidos nucleicos que también se denominan balizas moleculares, son un complemento inverso para la muestra de ácidos nucleicos que será detectada, y se hibrida debido a esto a una parte de la muestra de ácido nucleico que se ha de detectar. El momento de la unión a la muestra de ácido nucleico, se separan los grupos fluoróforos de la baliza  
30 molecular lo cual, da como resultado un cambio de la señal fluorescente, preferentemente un cambio de intensidad. Este cambio se correlaciona con la cantidad de muestras de ácidos nucleicos presentes.

Se reconocerá que la detección de C5a utilizando los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, permitirán particularmente la detección de C5a tal como aquí se define.

En conexión con la detección de C5a un método preferido comprende las siguientes etapas:

- 35 (a) proporcionar una muestra que se ha de analizar para determinar la presencia de C5a,  
     (b) proporcionar un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención,  
     (c) hacer reaccionar la muestra con el ácido nucleico, preferentemente en un recipiente de reacción.

con lo cual la etapa (a) puede llevarse a cabo antes de la etapa (b), o la etapa (b) se puede llevar a cabo antes de la etapa (a).

40 En una realización preferida se proporciona una etapa d) adicional, la cual consiste en la detección de la reacción de la muestra con el ácido nucleico. Preferentemente, el ácido nucleico de la etapa b) está inmovilizado en una superficie. La superficie puede ser la superficie de un recipiente de reacción tal como un tubo de reacción, un pocillo de una placa, o la superficie de un dispositivo contenido en dicho recipiente de reacción tal como, por ejemplo, un gránulo. La inmovilización del ácido nucleico en la superficie puede realizarse a través de cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, enlaces no covalentes o covalentes. Preferentemente, el enlace se establece a través de un enlace químico covalente entre la superficie y el ácido nucleico. Sin embargo, también está dentro de la presente invención que el ácido nucleico sea inmovilizado indirectamente en una superficie, por lo que dicha inmovilización indirecta implica el uso de un componente adicional o un par de parejas de interacción. Dicho componente adicional es preferentemente un compuesto el cual interactúa específicamente con el  
45 ácido nucleico que se ha de inmovilizar que es también denominado una pareja de interacción, y de esta forma media la unión del ácido nucleico a la superficie. La pareja de interacción se seleccionada preferentemente del grupo que comprende ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y anticuerpos. Preferentemente la pareja de interacción es un anticuerpo, más preferentemente, un anticuerpo monoclonal. Alternativamente, la pareja de interacción es un ácido nucleico, preferentemente un ácido nucleico funcional. Más preferentemente, dicho ácido nucleico funcional se  
50 selecciona del grupo que comprende aptámeros, espiegélmeros, y ácidos nucleicos los cuales son al menos parcialmente complementarios del ácido nucleico. En una realización alternativa adicional, la unión del ácido nucleico a la superficie es mediada por una pareja de interacción de partes múltiples. Dicha pareja de interacción de múltiples partes es preferentemente un par de parejas de interacción o una pareja de interacción que consiste en un primer miembro y en un segundo miembro, en donde el primer miembro está comprendido o unido al ácido nucleico  
55

y el segundo miembro está unido o comprendido en la superficie. La pareja de interacción de partes múltiples se selecciona preferentemente del grupo de pares de parejas de interacción que comprenden biotina y avidina, biotina y estreptavidina, y biotina y neutravidina. Preferentemente, el primer miembro del par de parejas de interacción es biotina.

- 5 Un resultado preferido de dicho método es la formación de un complejo inmovilizado de C5a y el ácido nucleico, con el se detecta más preferentemente dicho complejo. Está dentro de una realización que se detecte el C5a a partir del complejo.

10 Un medio de detección respectivo que cumple este requisito es, por ejemplo, cualquier medio de detección que sea específico para dicha/dichas parte(s) de la C5a. Un medio de detección particularmente preferido es un medio de detección el cual se selecciona del grupo que comprende ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y anticuerpos, cuya generación es conocida por los expertos en la técnica.

El método para la detección de C5a también comprende que la muestra sea retirada del recipiente de reacción, el cual ha sido utilizado preferentemente para llevar a cabo la etapa c).

15 El método comprende en una realización adicional también la etapa de inmovilizar una pareja de interacción de C5a en una superficie, preferentemente una superficie tal como se definió anteriormente, en donde la pareja de interacción es definida como aquí se indica, y preferentemente como se indicó anteriormente en relación con el método respectivo y más preferentemente comprende ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y anticuerpos en sus diversas realizaciones. En esta realización, un medio de detección particularmente preferido es un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, en donde dicho ácido nucleico puede estar preferentemente etiquetado o no

20 etiquetado. En el caso en el que dicho ácido nucleico esté etiquetado, puede ser detectado directa o indirectamente. Dicha detección también involucra el uso de un segundo medio de detección que se selecciona también preferentemente del grupo que comprende ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas y realizaciones en las diversas realizaciones aquí descritas. Dichos medios de detección son preferentemente específicos, para el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

25 En una realización más preferida, el segundo medio de detección es una baliza molecular. El ácido nucleico o el segundo medio de detección, o ambos, pueden comprender en una realización preferida una etiqueta de detección. La etiqueta de detección se selecciona preferentemente del grupo que comprende biotina, una etiqueta de bromo-desoxiuridina, una etiqueta de digoxigenina, una etiqueta de fluorescencia, una etiqueta de UV, una radio-etiqueta, y una molécula de quelante. Alternativamente, el segundo medio de detección interactúa con la etiqueta de detección la cual está preferentemente contenida, comprendida, o unida al ácido nucleico. Las combinaciones particularmente preferidas se indican a continuación:

30 la etiqueta de detección es biotina y el segundo medio de detección es un anticuerpo dirigido contra biotina, o en donde

la etiqueta de detección es biotina y el segundo medio de detección es una avidina o una molécula que lleva avidina, o en donde,

35 la etiqueta de detección es biotina y el segundo medio de detección es estreptavidina o es una molécula que lleva estreptavidina o en donde,

la etiqueta de detección es biotina y el segundo medio de detección es una neutravidina o una molécula que lleva neutravidina, o en donde

40 la etiqueta de detección es una bromo-desoxiuridina y el segundo medio de detección es un anticuerpo dirigido contra bromo-desoxiuridina, o en donde,

la etiqueta de detección es una digoxigenina y el segundo medio de detección es un anticuerpo dirigido contra digoxigenina, o en donde,

45 la etiqueta de detección es un quelante, y el segundo medio de detección es un radio-núclido, por lo que se prefiere que la etiqueta de detección esté al ácido nucleico. Será reconocido que este tipo de combinación también es aplicable a la realización en donde el ácido nucleico está unido a la superficie. En dicha realización, se prefiere que la etiqueta de detección esté unida a la pareja de interacción.

Finalmente, también está dentro de la presente invención que el segundo medio de detección sea detectado utilizando un tercer medio de detección, preferentemente el tercer medio de detección es una enzima, que muestra más preferentemente una reacción enzimática en el momento de la detección del segundo medio de detección, o el tercer medio de detección es un medio para detectar radiación, más preferentemente la radiación emitida por un radio-núclido. Preferentemente, el tercer medio de detección se detecta específicamente y/o interactúa con el segundo medio de detección.

También en la realización, con una pareja de interacción de C5a que está inmovilizada en una superficie y en donde el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se añade preferentemente al complejo formado entre la

pareja de interacción y el C5a, la muestra puede ser eliminada de la reacción, más preferentemente del recipiente de reacción donde se llevan a cabo la etapa c) y/o d).

En una realización, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende un resto fluorescente y en donde la fluorescencia del resto fluorescente es diferente en la formación del complejo entre el ácido nucleico y C5a y C5a libre.

En una realización adicional el ácido nucleico es un derivado del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, en donde el derivado del ácido nucleico comprende al menos un derivado fluorescente de adenosina que reemplaza a la adenosina. En una realización preferida el derivado fluorescente de adenosina es eteno-adenosina.

En una realización adicional el complejo consiste en el derivado del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y la C5a se detecta utilizando fluorescencia.

En una realización del método se crea una señal en la etapa (c) o la etapa (d) y preferentemente la señal está correlacionada con la concentración de C5a en la muestra.

En un aspecto preferido, los ensayos pueden llevarse a cabo en placas de 96 pocillos, en donde los componentes son inmovilizados en los recipientes de reacción tal como se describe anteriormente, y los pocillos actúan como recipientes de reacción.

El ácido nucleico de la invención puede ser utilizado además como material de partida para el diseño de fármacos. Básicamente existen dos métodos posibles. Un método es el cribado de colecciones de compuestos en donde dichas colecciones de compuestos son preferentemente colecciones de compuestos de bajo peso molecular. En una realización, el cribado es un cribado de alto rendimiento. Preferentemente, el cribado de alto rendimiento es la evaluación rápida, eficaz, de prueba y error de los compuestos en un ensayo basado en dianas. En el mejor caso el análisis se lleva a cabo a través de una medida colorimétrica. Las colecciones tal como se utilizan en relación con esto, son conocidas por los expertos en la técnica.

Alternativamente, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede ser utilizado para el diseño racional de fármacos. Preferentemente, el diseño racional de fármacos es el diseño de una estructura principal farmacéutica.

Comenzando a partir de la estructura tridimensional de la diana que normalmente es identificada por métodos tales como cristalografía de rayos-X o espectroscopía de resonancia magnética nuclear, se utilizan programas de ordenador para buscar en las bases de datos que contienen estructuras de muchos diferentes compuestos químicos. La selección se lleva a cabo a través de un ordenador, pudiendo ser probados los compuestos identificados subsecuentemente en el laboratorio.

El diseño racional de fármacos puede comenzar a partir de cualquiera de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención e implica una estructura, preferentemente, una estructura tridimensional, que sea similar a la estructura de los ácidos nucleicos de la invención o idéntica a las partes que median la unión de la estructura de los ácidos nucleicos de la invención. En cualquier caso, dicha estructura aún muestra la misma o similar característica de unión que la de los ácidos nucleicos de la invención. Ya sea en una etapa adicional o como una etapa alternativa en el diseño racional de fármacos, preferentemente la estructura tridimensional de dichas partes de los ácidos nucleicos que se unen al neurotransmisor, están mimetizadas por grupos químicos que son diferentes de nucleótidos y ácidos nucleicos. A través de esta mimetización, se puede diseñar un compuesto diferente de los ácidos nucleicos. Dicho compuesto es preferentemente una molécula pequeña o un péptido.

En el caso de cribado de colecciones de compuestos, tal como por el uso de un ensayo competitivo que es conocido por los expertos en la técnica, se pueden encontrar análogos de C5a, agonistas de C5a o antagonistas de C5a adecuados. Dichos ensayos competitivos pueden establecerse como se indica a continuación. El ácido nucleico de la invención, preferentemente, un espiegélmero que es un ácido L-nucleico de unión a diana, se acopla a una fase sólida. Con el objeto de identificar análogos de C5a se puede añadir C5a etiquetado al ensayo. Un análogo potencial puede competir con las moléculas de C5a que se unen al espiegélmero, lo cual iría acompañado por una disminución en la señal obtenida por la etiqueta respectiva. El cribado de agonistas o antagonistas puede implicar el uso de un ensayo de cultivo celular tal como lo conocen los expertos en la técnica.

El kit de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos uno o varios de los ácidos nucleicos de la invención. Además, el kit puede comprender al menos uno o varios controles positivos o negativos. Un control positivo puede ser, por ejemplo, C5a, particularmente uno contra el cual se selecciona el ácido nucleico de la invención o al cual se une, preferentemente, en forma líquida. Un control negativo puede ser, por ejemplo, un péptido que es definido en términos de propiedades biofísicas similares a C5a, pero que no es reconocido por los ácidos nucleicos de la invención. Además, dicho kit puede comprender uno o varios tampones. Los diferentes ingredientes pueden estar contenidos en el kit en forma seca o liofilizada, o disueltos en un líquido. El kit puede comprender uno o más contenedores que a su vez pueden contener uno o varios ingredientes del kit. En una realización adicional, el kit comprende una instrucción o folleto de instrucciones que proporciona al usuario información respecto al uso del equipo y sus diversos ingredientes.

La determinación farmacéutica y bioanalítica del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, es elemental para la evaluación de su perfil farmacocinético y biodinámico en varios humores, tejidos y órganos del cuerpo humano y no humano. Para dicho propósito, cualesquiera de los métodos de detección aquí descritos o conocidos por los expertos en la técnica pueden ser utilizados. En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un ensayo de hibridación de tipo sándwich para la detección del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Dentro del ensayo de detección, se utiliza una sonda de captura y una sonda de detección. La sonda de captura es complementaria de la primera parte, y la sonda de detección de la segunda parte del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Ambas, la sonda de captura y de detección, pueden estar formadas por nucleótidos de DNA, nucleótidos de DNA modificados, nucleótidos de RNA modificados, nucleótidos de RNA, nucleótidos de LNA y/o nucleótidos de PNA.

Por lo tanto, la sonda de captura comprende un tramo de secuencia complementario del extremo 5' del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, y la sonda de detección comprende un tramo de secuencia complementario del extremo 3' del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. En este caso la sonda de captura se inmoviliza en una superficie o matriz por medio de su extremo 5', con lo que la sonda de captura puede ser inmovilizada directamente en su extremo 5' o por medio de un enlazador entre su extremo 5' y la superficie o matriz. Sin embargo, en principio el enlazador puede ser enlazado a cada nucleótido de la sonda de captura. El enlazador puede estar formado por enlazadores hidrófilos conocidos en la técnica o por nucleótidos de D-DNA, nucleótidos de D-DNA modificados, nucleótidos de D-RNA, nucleótidos de D-RNA modificados, nucleótidos de D-LNA, nucleótidos de PNA, nucleótidos de L-RNA, nucleótidos de L-DNA, nucleótidos de L-RNA modificados, nucleótidos de L-DNA modificados y/o nucleótidos de L-LNA.

Alternativamente, la sonda de captura comprende un tramo de secuencia complementario del extremo 3' del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y la sonda de detección comprende un tramo de secuencia complementario del extremo 5' del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. En este caso, la sonda de captura se inmoviliza en una superficie o matriz por medio de su extremo 3' con lo que la sonda de captura se puede inmovilizar directamente en su extremo 3' o por medio de un enlazador entre su extremo 3' y la superficie o matriz. Sin embargo, en principio, el enlazador puede ser enlazado a cada nucleótido del tramo de secuencia que es complementario del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El enlazador puede estar formado por enlazadores hidrófilos conocidos en la técnica o por nucleótidos de D-DNA, nucleótidos de D-DNA modificados, nucleótidos de D-RNA, nucleótidos de D-RNA modificados, nucleótidos de D-LNA, nucleótidos de PNA, nucleótidos de L-RNA, nucleótidos de L-DNA, nucleótidos de L-RNA modificados, nucleótidos de L-DNA modificados y/o nucleótidos de L-LNA.

El número de nucleótidos de las sondas de captura y detección que pueden hibridarse con el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, es variable y puede depender del número de nucleótidos de la sonda de captura y/o de detección y/o el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El número total de nucleótidos de las sondas de captura y de detección que puede hibridarse con el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, debe ser el número máximo de nucleótidos que están contenidos en el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El número mínimo de nucleótidos (2 a 10 nucleótidos) de la sonda de detección y de captura debe permitir la hibridación con el extremo 5' o el extremo 3', respectivamente, del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Con el objeto de conseguir altas especificidad y selectividad entre el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y otros ácidos nucleicos que existen en las muestras que son analizadas, el número total de nucleótidos de las sondas de captura y de detección debe ser el número máximo de nucleótidos que están contenidos en el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

Además, la sonda de detección lleva preferentemente una molécula marcadora o etiqueta que puede ser detectada tal como se describió anteriormente. La etiqueta o molécula marcadora en principio puede unirse a cada nucleótido de la sonda de detección. Preferentemente, la etiqueta o marcador se localiza en el extremo 5' o en el extremo 3' de la sonda de detección, por lo cual se puede insertar un enlazador entre los nucleótidos dentro de la sonda de detección que son complementarios del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y la etiqueta. El enlazador puede estar formado por enlazadores hidrófilos conocidos en la técnica o por nucleótidos de D-DNA, nucleótidos de D-DNA modificados, nucleótidos de D-RNA, nucleótidos de D-RNA modificados, nucleótidos de D-LNA, nucleótidos de PNA, nucleótidos de L-RNA, nucleótidos de L-DNA, nucleótidos de L-RNA modificados, nucleótidos de L-DNA modificados y/o nucleótidos de L-LNA.

La detección del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo como se indica a continuación:

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se hibrida por uno de sus extremos con la sonda de captura y por el otro extremo con la sonda de detección. Posteriormente se elimina la sonda de detección no unida mediante, por ejemplo, uno o varias etapas de lavado. La cantidad de sonda de detección unida que lleva preferentemente una etiqueta o molécula marcadora, se puede medir subsecuentemente como, por ejemplo, se describe con detalle en WO/2008/052774.

Tal como se utiliza previamente en la presente invención, el término "tratamiento" comprende en una realización preferida la prevención y/o seguimiento adicional o alternativo.

Tal como se utiliza previamente en la presente invención, los términos “enfermedad y trastorno” deben utilizarse en una forma intercambiable, si no se indica lo contrario.

5 Tal como se usa en la presente invención, el término “comprende”, preferentemente no está destinado a limitar el seguido seguido o descrito por dicho término. Sin embargo, en una realización alternativa, el término “comprende”, debe entenderse en el significado de que contiene, y por lo tanto limita el objeto seguido o descrito por dicho término.

Las diversas SEQ.ID.NO, la naturaleza química de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y las moléculas dianas C5a tal como aquí se utilizan, su secuencia real de las mismas y el número de referencia interno se resumen en la siguiente tabla.

SEQ ID NO.	Referencia interna		Secuencia
1	274-B5-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUGGGUGUCGACGCACAGGC
2	274-D5-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUGGGUGUCGACGCACAGGC
3	274-C8-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCACAGGC
4	274-C8-002-G14 (=NOX-D19001)	L-RNA	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCACAGGC
5	274-C5-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUGGGUGUCGACGCACAGGC
6	274-G6-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUGGGUGUCGACGCACAGGC
7	274-H6-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUGGGUGUCGACGCACAGGC
8	NOX-D19001-D09	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>d</u> UGGUUGUAGGGUUGUGGGUGUCGACGCACAGGC
9	NOX-D19001-D16	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUUGGU <u>d</u> GAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCACAGGC
10	NOX-D19001-D17	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUUGGU <u>d</u> AAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCACAGGC
11	NOX-D19001-D30	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UGUCGACGCACAGGC
12	NOX-D19001-D32	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUUGGGUG <u>d</u> UCGACGCACAGGC
13	NOX-D19001-D40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCC <u>d</u> CAGGC
14	NOX-D19001-D09-30	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>d</u> UGGUUGUAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UGUCGACGCACAGGC
15	NOX-D19001-D09-32	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>d</u> UGGUUGUAGGGUUGUUGGGUG <u>d</u> UCGACGCACAGGC
16	NOX-D19001-D09-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>d</u> UGGUUGUAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCC <u>d</u> CAGGC
17	NOX-D19001-D30-32	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCACAGGC
18	NOX-D19001-D30-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UGUCGACGCC <u>d</u> CAGGC
19	NOX-D19001-D32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUUGGGUG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
20	NOX-D19001-D09-30-32	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>d</u> UGGUUGUAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCACAGGC
21	NOX-D19001-D09-30-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>d</u> UGGUUGUAGGGUUGUUGGGUG <u>d</u> UGUCGACGCC <u>d</u> CAGGC
22	NOX-D19001-D09-32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>d</u> UGGUUGUAGGGUUGUUGGGUG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
23	NOX-D19001-D30-32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUUGUAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
24	NOX-D19001-D09-30-32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>d</u> UGGUUGUAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
25	NOX-D19001-D09-16-30-32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> GAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
26	NOX-D19001-D09-17-30-32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
27	NOX-D19001-D09-16-17-30-32-40 (= NOX-D19001-6xDNA)	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
28	NOX-D19001-6xDNA-007	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCUGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
29	NOX-D19001-6xDNA-008	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
30	NOX-D19001-6xDNA-009	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	UGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
31	NOX-D19001-6xDNA-010	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
32	NOX-D19001-6xDNA-011	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCUGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAGGC
33	NOX-D19001-6xDNA-012	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GUGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CAC
34	NOX-D19001-6xDNA-013	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	UGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CA
35	NOX-D19001-6xDNA-018	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CGGC
36	NOX-D19001-6xDNA-019	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GGCGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CGCC
37	NOX-D19001-6xDNA-020 (=NOX-D20001)	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCGAUG <u>d</u> UGGUUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AAGGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CGC

SEQ ID NO.	Referencia interna		Secuencia
38	NOX-D19001-6xDNA-021	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> CAGC
39	NOX-D19001-6xDNA-022	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	UGAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> CAGC
40	NOX-D19001-6xDNA-023	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CGAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> CAGC
41	NOX-D19001-6xDNA-024	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> CAGC
42	NOX-D19001-6xDNA-025	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCUGAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> CAC
43	NOX-D19001-6xDNA-026	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCUGAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> CC
44	NOX-D19001-6xDNA-027	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCUGAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> CA
45	NOX-D19001-6xDNA-028	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CGAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> CGC
46	NOX-D19001-6xDNA-029	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> CGC
47	NOX-D19001-6xDNA-030	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCGAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> CC
48	NOX-D19001-6xDNA-032	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCGAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> C
49	NOX-D19001-6xDNA-033	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GGAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GdAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> dUCGACGCC <u>d</u> CC
50	C5a humana	L-proteína	TLOKKIEEIAAKYKHSVVKCCYDGACVNNDDETCEQRAARISLGTECCVVASQLRANISHKDMQLGR
51	C5a de rata	L-proteína	DLQLLHQKVEEQAAKYKHRVPKKCCYDGARENKYETCEQRVARVRAFNECCTIADKIRKESHHKGMQLGR
52	C5a de ratón	L-proteína	NLHLLRQKIEEQAAKYKHSVPKKCCYDGARVNFYETCEERVARVRAFNECCTIANKIRKESPHKPVQLGR
53	C5 humana, cadena alfa	L-proteína	TLOKKIEEIAAKYKHSVVKCCYDGACVNNDDETCEQRAARISLGTECCVVASQLRANISHKDMQLGRLLHMKTLLPVSKEIRSYFPESVPRRKQLQFALPDSLTTWEIQGIGISNTGIVADTVKAKVFKDVYSVVRGEQIQLKGTVYNVRTSGMQFCVKMSAVEGICTSESPVIDKCVRQKVEGSSSHLVTFTVLPIGLHNINFSLTWFGEILVKGVKRESYSGVTLDPRTGYGTISRKEFPYRIPLDLVPKTEIKRIIVGEILSAVLSQEGINILTHLPKGSAEELMSVPPVFVYFHYLETHSDPLIEQKQLKKKLKEGMLSIMSYRNADYSYSVWKGGSASTWL LGQVNKYVEQNQNSICNSLLWLVENYQLDNGSFKENSQYQPIKLARENNSLYLTAFTVIGIRKAFCDICPLVKIDTALIKADNFLENTLIALISAYALS LGDKTPQFRSIVSALKREALVKGNPPIYRFWKDNIVPNTGTARMVETTAYALLTSNLKDINYVNPVIKWLSSEQRYGGCTINAIEGLTEYSLLVQKQLRLSMSIDVSYKHKGALHNKMTDKNFI LLNDDLIVSTGFGSGLATVHVTVVHKTSTSEEVCSFYLKIDTQIRGYGNSDYKRIVACASYKPSREESSSGSSHAVMDISLPTGISANI VEGVDQLFTDYQIKDGHVILQLNSIPSSDFLCVRFRIFELFEVGTVYEYHRPDQKCTMFYSTSNIKIQKVCEGAACKCVEADCGQMQEAETRKQTACKPEIAYAYKVSITSITVENVFVKYKATLLDIYKTGSEITFIKKVCTNAELVKGRQYLIMGKEALQIKYNFSFRYIYPLIYWPRDTTCSSCQAFLANLDEFAEDIFLNGC
54	C5a de mono Rhesus		MLQEKKIEEIAAKYKHLVVKKCCYDGVRINHDETCEQRAARISVGTECCVVASQLRANNSHKDLQLGR
55	NOX-D19001-020		GCGAUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCC
56	NOX-D19001-1xDNA-020	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCGAUG <u>d</u> UGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCC
57	NOX-D19001-2xDNA-020	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCGAUG <u>d</u> UGGUGGUGAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> UCGACGCC
58	NOX-D19001-3xDNA-020	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCGAUG <u>d</u> UGGUGGUGAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> UCGACGCC
59	NOX-D19001-2dU-1dc-020 (=NOX-D21001)	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCGAUG <u>d</u> UGGUGGUGAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> UCGACGCC <u>d</u> CGC
60	NOX-D19001-3dU-1dc-020	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCGAUG <u>d</u> UGGUGGUGAAGGGUUGUUGGG <u>d</u> U <u>g</u> UCGACGCC <u>d</u> CGC
61		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGKUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> RGGGHUGUKGGGn <sub>4</sub> Gr <sub>5</sub> CGACGCA donde n <sub>1</sub> es U o <u>d</u> U, n <sub>2</sub> es G o <u>d</u> G, n <sub>3</sub> es A o <u>d</u> A, n <sub>4</sub> es U o <u>d</u> U, n <sub>5</sub> es U o <u>d</u> U
62		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGUUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> AGGGUUGUGGGGn <sub>4</sub> Gr <sub>5</sub> CGACGCA donde n <sub>1</sub> es U o <u>d</u> U, n <sub>2</sub> es G o <u>d</u> G, n <sub>3</sub> es A o <u>d</u> A, n <sub>4</sub> es U o <u>d</u> U, n <sub>5</sub> es U o <u>d</u> U

SEQ ID NO.	Referencia interna		Secuencia
63		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGUUUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> GGGUUUGUUGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGCA donde n <sub>1</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>2</sub> es G o <u>dG</u> , n <sub>3</sub> es A o <u>dA</u> , n <sub>4</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>5</sub> es U o <u>dU</u>
64		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGUUUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> AGGGUUGUUGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGCA donde n <sub>1</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>2</sub> es G o <u>dG</u> , n <sub>3</sub> es A o <u>dA</u> , n <sub>4</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>5</sub> es U o <u>dU</u>
65		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGGUUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> AGGGUUGUUGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGCA donde n <sub>1</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>2</sub> es G o <u>dG</u> , n <sub>3</sub> es A o <u>dA</u> , n <sub>4</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>5</sub> es U o <u>dU</u>
66		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGGUUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> GGGUUUGUGGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGCA donde n <sub>1</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>2</sub> es G o <u>dG</u> , n <sub>3</sub> es A o <u>dA</u> , n <sub>4</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>5</sub> es U o <u>dU</u>
67		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGGUUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> GGGAUGUGGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGCA donde n <sub>1</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>2</sub> es G o <u>dG</u> , n <sub>3</sub> es A o <u>dA</u> , n <sub>4</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>5</sub> es U o <u>dU</u>
68		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGUUUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> GGGCUGUGGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGCA donde n <sub>1</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>2</sub> es G o <u>dG</u> , n <sub>3</sub> es A o <u>dA</u> , n <sub>4</sub> es U o <u>dU</u> , n <sub>5</sub> es U o <u>dU</u>
69		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGGUGKUGARGGGHUGKGGGUGUCGACGCA
70		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGGUGUUGAAGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
71		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGGUGGUGAAGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
72		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGGUGGUGAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
73		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>d</u> UGGUGGUGAAGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
74		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGGUGGU <u>d</u> GAAGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
75		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGGUGGUG <u>d</u> AAGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
76		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGGUGGUGAAGGUUGUUGGG <u>d</u> UGUCGACGCA
77		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGGUGGUGAAGGUUGUUGGGUG <u>d</u> UCGACGCA
78		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>d</u> UGGUGGUGAAGGUUGUUGGG <u>d</u> UGUCGACGCA
79		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>d</u> UGGUGGUGAAGGUUGUUGGG <u>d</u> UGUCGACGCA
80		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGGUGGUGAAGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCA
81		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>d</u> UGGUGGUGAAGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCA
82		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GAAGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCA
83		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> GAAGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCA
84		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCA
85	274-H6-002	D-RNA	GCCUGAUGUGGUUGAGGGCUGUGGGGUGUCGACGCCACAGGC
86	274-D5-002	D-RNA	GCCUGAUGUGGUUGAGGGGUUGUGGGGUGUCGACGCCACAGGC
87	revNOX-D19	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDaPEG- CGGACACGCAGCUGUGGGUJUGUUGGGAAAGUGGUGGUAGUCCG
88	revNOX-D21	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDaPEG-- CGdCACGCAGCUGdUGGUUGUUGGGAAAGUGGUGGdUGUAGCG
89	D-C5a de ratón biotinilada	D-proteína	LLRQKIEEQAQKYKHSVPKKCCYDGARVNFYETCEERVARVTIGI NECCTIANKIRKESPHKPVQLGR- Biotin
90	NOX-D19001-5'40kDa-PEG (= NOX-D19)	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDaPEG- GCCUGAUGUGGUUGGUGAAGGUUGUUGGGUGUCGACGCCACAGGC
91	NOX-D19001-6xDNA-020-5'40kDa-PEG (= NOX-D20)	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDaPEG- GCGAUG <u>d</u> UGGUGGU <u>d</u> G <u>d</u> AGGUUGUUGGG <u>d</u> UG <u>d</u> UCGACGCC <u>d</u> CGC
92	NOX-D19001-2dU-1dC-020-5'40kDa-PEG (= NOX-D21)	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDaPEG- GCGAUG <u>d</u> UGGUGGUUGAGGUUGUUGGG <u>d</u> UGUCGACGCC <u>d</u> CGC
93	des-ArgC5a humana	L-proteína	TLQKKIEEIAAKYKHSVVKCCYDGACVNNDTCEQRAARISLG TECCVVASQLRANISHKDMQLG
94	des-ArgC5a de ratón	L-proteína	NLHLLRQKIEEQAQKYKHSVPKKCCYDGARVNFYETCEERVARV RAFNECCTIANKIRKESPHKPVQLG

La presente invención se ilustra además a través de las figuras, ejemplos y el listado de secuencias de los cuales se pueden extraer características, realizaciones y ventajas adicionales, en donde

- Fig. 1 muestra una alineación de secuencias de moléculas de ácidos nucleicos capaces de unirse a C5a humana y de ratón, incluyendo el valor de  $K_D$  y la actividad de unión relativa a C5a humana y de ratón tal como se determina por medida de resonancia de plasmón superficial;
- Fig. 2 muestra derivados de la molécula de ácido nucleico NOX-D19001 con una sola sustitución de ribonucleótido por 2'-desoxirribonucleótido, incluyendo el valor de  $K_D$  y la actividad de unión relativa a C5a humana tal como se determina por medida de resonancia de plasmón superficial;
- Fig. 3 muestra derivados de la molécula de ácido nucleico NOX-D19001 con dos, tres, cuatro, cinco, o seis sustituciones de ribonucleótidos por 2'-desoxirribonucleótido, incluyendo el valor de  $K_D$  y la actividad de unión relativa a C5a humana tal como se determina por medida de resonancia de plasmón superficial;
- Fig. 4A+B muestra truncamientos de la molécula de ácido nucleico NOX-D19001-6xDNA, incluyendo el valor de  $K_D$  y la actividad de unión relativa a C5a humana tal como se determina por medida de resonancia de plasmón superficial;
- Fig. 5 muestra derivados de la molécula de ácido nucleico NOX-D20001 con ninguna, una, dos, tres o cuatro sustituciones de ribonucleótidos por 2'-desoxirribonucleótidos incluyendo el valor de  $K_D$  y la actividad de unión relativa a C5a humana. tal como se determina por medida de resonancia de plasmón superficial;
- Fig. 6 muestra la evaluación cinética por medida en Biacore de las moléculas de ácido nucleico NOX-D19001, NOX-D19001-D09 y NOX-D19001-D09-16-17-30-32-40 (también denominada como NOX-D19001-6xDNA) para C5a humana, en donde se muestran los datos para 500 nM de espiegélmero NOX-D19001, NOX-D19001-D09 (abreviadamente D09) y NOX-D19001-D09-16-17-30-32-40 (abreviadamente D09-16-17-30-32-40);
- Fig. 7 es un diagrama que muestra la eficacia de los espiegélmeros de unión a C5a PEGilados de 40 kDa en 5'-terminal NOX-D19001-5'PEG (también denominada NOX-D19), NOX-D20 (también denominada NOX-D19001-6xDNA-020-5' 40kDa PEG) en ensayos de quimiotaxis, en donde las células se dejaron migrar hacia huC5a 0,1 nM preincubada a 37°C con diversas cantidades de espiegélmeros;
- Fig. 8 muestra la evaluación cinética por medida Biacore de las moléculas de ácido nucleico NOX-D20 (también denominada NOX-D19001-6xDNA-020-5' 40kDa PEG) para C5a humana, C5a de rata, C5a de ratón, C5a de mono; en donde se muestran los datos para 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, y 1,95-0 nM del espiegélmero NOX-D20;
- Fig. 9 muestra la evaluación cinética por medida Biacore de las moléculas de ácido nucleico NOX-D20 (también denominada NOX-D19001-6xDNA-020-5' 40kDa PEG) para C5 humana, y desArg-C5a humana, en donde se muestran los datos para 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, y 1,95-0 nM del espiegélmero NOX-D20;
- Fig.10 muestra la evaluación cinética por medida Biacore de las moléculas de ácido nucleico NOX-D21 (también denominadas como NOX-D19001-2dU-1dC-020-5' 40kDa PEG) para C5a humana, desArg-C5a humana, C5a de ratón y desArg-C5a de ratón; en donde se muestran los datos para 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, y 1,95-0 nM del espiegélmero NOX-D21 de unión a C5a humana y a C5 humana;
- Fig.11 muestra la alineación de secuencia de polipéptidos de C5a procedentes de ser humano, mono Rhesus, ratón y rata;
- Fig.12A es un diagrama que muestra la eficacia de los espiegélmeros NOX-D20 de unión a C5a en ensayos de quimiotaxis con C5a humana y C5a de ratón, las células se dejaron migrar hacia huC5a 0,1 nM o mC5a 0,3 nM preincubadas a 37°C con diversas cantidades de espiegélmeros; en donde a) los recuentos celulares se normalizaron para el valor más grande de cada conjunto de datos y se expresan como porcentaje de recuento frente a la concentración de espiegélmero, b) las concentraciones de espiegélmeros a las se inhibe la quimiotaxis en un 50% ( $IC_{50}$ ) fueron calculadas utilizando regresión no lineal (ajuste de cuatro parámetros) con el programa informático Prism5;
- Fig.12B es un diagrama que muestra la eficacia del espiegélmero NOX-D21 de unión a C5a en ensayos de quimiotaxis con C5a humana, las células se dejaron migrar hacia huC5a 0,1 nM preincubada a 37°C con diversas cantidades de espiegélmero, en donde a) los recuentos celulares se normalizaron para el valor más grande de cada conjunto de datos y se ilustran como un recuento en porcentaje frente a la concentración de espiegélmero, b) las concentraciones de espiegélmero en las cuales la quimiotaxis se inhibe en un 50% ( $IC_{50}$ ) fueron calculadas utilizando regresión no lineal (ajuste de cuatro parámetros) con el programa informático Prism5;

- Fig. 13 es un diagrama que muestra la eficacia de los espiegélmeros NOX-D19 y NOX-D20 de unión a C5a en (A) ensayos de quimiotaxis y (B) ensayos de liberación de elastasa de PMN humanos primarios con C5a humana; en donde las células se dejaron migrar hacia huC5a 1 nM y se estimuló la liberación de elastasa por huC5a 30 nM preincubada a 37°C con diversas cantidades de espiegélmeros;
- 5 Fig. 14 es un diagrama que muestra la evaluación de la inhibición de la escisión de C5 utilizando un ensayo de hemólisis de eritrocito de oveja con los espiegélmeros (A) NOX-D19 y NOX-D20 y (B) NOX-D21. Se muestran controles positivos (C5C6) y negativos (revNOX-D19 y revNOX-D21);
- 10 Fig. 15 es un diagrama que muestra la supervivencia en el modelo de ratón con ligamiento y punción cecal (CLP) de septicemia polimicrobiana; NOX-D19 en las dosis indicadas o el vehículo se inyectó por vía intraperitoneal diariamente comenzando justo después de la cirugía CLP. Los animales de simulación recibieron cirugía sin CLP, seguido de inyecciones de vehículo;
- 15 Fig. 16 es un diagrama que muestra (A) niveles de creatinina en suero y (B) niveles de nitrógeno de urea en sangre (BUN) previos a la cirugía (día - 4) y el día 1 después de la cirugía CLP en ratones tratados con NOX-D19 en las dosis indicadas, en ratones tratados con vehículo y en animales de simulación. La creatinina en suero y BUN son biomarcadores para la función renal;
- 20 Fig. 17 es un diagrama que muestra (A) niveles en suero de alanina-aminotransferasa (ALT) y (B) niveles en suero de aspartato-aminotransferasa (AST) previos a la cirugía (día - 4) y en el día 1 después de la cirugía CLP en ratones tratados con NOX-D19 en las dosis indicadas, en ratones tratados con vehículo y en animales de simulación. ALT en suero es un biomarcador para daño hepatocelular. AST en suero es un biomarcador para insuficiencia multiorgánica;
- 25 Fig. 18 es un diagrama que muestra la supervivencia en el modelo de ratón de ligamiento y punción cecal (CLP) de septicemia polimicrobiana; se inyectó NOX-D20 en las dosis indicadas o vehículos por vía intraperitoneal diariamente comenzando justo después de la cirugía CLP. Un grupo recibió una sola dosis de 1 mg/kg de NOX-D20 justo después de la cirugía CLP seguido de inyecciones de vehículo diarias. A los animales de simulación se les realizó cirugía sin CLP, seguida de inyecciones de vehículo;
- 30 Fig. 19 es un diagrama que muestra (A) niveles de creatinina en suero, (B) nitrógeno de urea en sangre (BUN) y (C) niveles en suero de alanina-aminotransferasa (ALT) y el día 1 después de la cirugía CLP en ratones tratados con NOX-D20 en las dosis indicadas, en ratones tratados con vehículo y en animales de simulación. La creatinina en suero y BUN son biomarcadores de la función renal. ALT en suero es un biomarcador para daño hepatocelular;
- 35 Fig. 20 es un diagrama que muestra el efecto del tratamiento con NOX-D20 en las dosis indicadas en (A) lactato-deshidrogenasa (LDH) en suero, un biomarcador para lesión de tejido, (B) fuga vascular y (C) infiltración de PMN en el peritoneo el día 1 después de la cirugía CLP. Los ratones tratados con vehículo y los animales de simulación se muestran como controles;
- 40 Fig. 21 es un diagrama que muestra la supervivencia en un modelo de lesión de riñón aguda inducida por lesión por isquemia/reperfusión; NOX-D21 en la dosis indicada o vehículo se inyectó por vía intravenosa 1 hora antes de la cirugía y subsecuentemente por vía intraperitoneal cada 24 horas durante 3 días;
- Fig. 22 muestra los 2'-desoxirribonucleótidos que contienen las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención;
- 45 Fig. 23 muestra los ribonucleótidos que contienen las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

#### **Ejemplo 1: Moléculas de ácido nucleico capaces de unirse a C5a humana y de ratón**

Se identificaron varias moléculas de ácido nucleico de unión a C5a y sus derivados: sus secuencias de nucleótidos se ilustran en las Figuras 1 a 5. Las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a se caracterizaron como:

- 45 a) aptámeros, es decir moléculas de ácido D-nucleico que utilizan un ensayo *pull-down* directo (Ejemplo 3) y/o un ensayo *pull-down* de competición comparativo (Ejemplo 3)
- b) espiegélmeros, es decir moléculas de ácido L-nucleico por medida de resonancia de plasmón superficial (Ejemplo 4) y por un ensayo *in vitro* con células que expresan el receptor de C5a humana (Ejemplo 5). Además los espiegélmeros se analizaron para determinar la inhibición de la activación de neutrófilos humanos primarios inducida por C5a (Ejemplo 6) e *in vivo* (Ejemplo 8, 9 y 10). Los espiegélmeros y aptámeros se sintetizaron tal como se describe en el Ejemplo 2.

Las moléculas de ácido nucleico generadas de esta forma exhiben secuencias ligeramente diferentes, por lo que las secuencias se pueden resumir o agrupar como una familia de secuencias.

Para la definición de los motivos de secuencias de ribonucleótidos, se utilizaron las abreviaturas de la IUPAC para los nucleótidos ambiguos:

S	fuerte	G o C
W	débil	A o U
R	purina	G o A
Y	pirimidina	C o U
K	ceto	G o U
M	imino	A o C
B	no A	C o U o G
D	no C	A o G o U
H	no G	A o C o U
V	no U	A o C o G
N	todos	A o G o C o U

- 5 Si no se indica lo contrario, cualquier secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de tramos, respectivamente, se indican en la dirección 5' → 3'.

Para diferenciación entre los 2'-desoxirribonucleótidos y los ribonucleótidos se utilizaron las siguientes abreviaturas:

Para 2'-desoxirribonucleótidos: dG, dC, dT, dA y dU (véase la Fig. 22).

Para ribonucleótidos: G, C, T, U (véase la Fig. 23).

- 10 Tal como se describe en las Figuras 1 a 5 las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a comprenden una tramo central de nucleótidos que define un motivo de unión a C5a potencial, en donde la Figura 1 muestra las diferentes secuencias de la familia de secuencias, las Figuras 2 a 5 muestran derivados de la molécula de ácido nucleico NOX-D19001 que incluye NOX-D20001 (también denominada NOX-D19001-6x-DNA-020, Figura 4A) y NOX-D21001 (también denominada NOX-D19001-2dU-1dC-020, Figura 5).

- 15 En general, las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a comprenden en el extremo 5' y el extremo 3' tramos terminales de nucleótidos: el primer tramo terminal de nucleótidos y el segundo tramo terminal de nucleótidos. El primer tramo terminal de nucleótidos y el segundo tramo terminal de nucleótidos pueden hibridarse entre sí, por lo cual debido a la hibridación se forma una estructura bicatenaria. Sin embargo, dicha hibridación no se da necesariamente en la molécula *in vivo* e *in vitro*.

- 20 Los tres tramos de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico de unión a C5a – el primer tramo terminal de nucleótidos, el tramo central de nucleótidos y el segundo tramo terminal de nucleótidos – están dispuestos en la dirección 5' → 3': el primer tramo terminal de nucleótidos – el tramo central de nucleótidos – el segundo tramo terminal de nucleótidos. Sin embargo, alternativamente, el primer tramo terminal de nucleótidos, el tramo central de nucleótidos y el segundo tramo terminal de nucleótidos están dispuestos en la dirección 5' → 3': el segundo tramo terminal de nucleótidos - el tramo central de nucleótidos - el primer tramo terminal de nucleótidos.

- 25 La secuencia de los tramos definidos puede ser diferente entre las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a que influyen en la afinidad de unión a C5a. Basándose en el análisis de unión de las diferentes moléculas de ácido nucleico de unión a C5a, el tramo central de nucleótidos y sus secuencias de nucleótidos, tal como se describen a continuación, son individualmente, y más preferentemente en su totalidad, esenciales para la unión a C5a humana.

- 30 Las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a de acuerdo con la presente invención, tal como se muestra en la Figura 1, consisten en ribonucleótidos y se muestran en las Figuras 1 a 5. La molécula de ácido nucleico de unión a C5a, 274-H6-002, se analizó como un aptámero en ensayos *pull-down* de competición comparativa (para el protocolo véase el Ejemplo 3) frente al ácido nucleico de unión a C5a, 274-D5-002. La molécula de ácido nucleico de unión a C5a, 274-H6-002, mostró afinidad de unión más débil en comparación con la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, 274-D5-002. Las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a, 274-B5-002, 274-D5-002, 274-C8-002, 274-C8-002-G14 (= NOX-D19001), 274-C5-002 y 274-G6-002, se analizaron como espiegélmeros por su capacidad para unirse a C5a humana y de ratón por medida de resonancia de plasmón (véase el Ejemplo 4, Figura 1).

La molécula de ácido nucleico de unión a C5a, 274-C8-002-G14 (= NOX-D19001) muestra la mejor afinidad de unión a con una  $K_D$  de 0,3 nM para C5a de ratón y con una  $K_D$  de 1,38 nM para C5a humana (Figura 1).

- 40 Las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a, 274-B5-002, 274-D5-002, 274-C8-002, 274-C8-002-G14 (= NOX-D19001), 274-C5-002, 274-G6-002 y 274-H6-002, comparten la secuencia:

5' AUGUGGUGKUGARGGGHUGUKGGGUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 69],

en donde G, A, U, C, H, K, y R son ribonucleótidos.

Las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a, 274-C8-002, 274-C8-002-G14 (= NOX-D19001) y 274-C5-002 mostraron la mejor afinidad de unión a C5a y comprenden las siguientes secuencias para el tramo central:

- a) 274-C8-002: 5' AUGUGGUGUUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA 3'[SEQ ID NO: 70],
- b) 274-C8-002-G14: 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 71],
- c) 274-C5-002: 5' AUGUGGUGGUGAGGGGUUGUGGGGUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 72],

5

en donde G, A, U y C son ribonucleótidos.

Los inventores mostraron sorprendentemente que la afinidad de unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 se mejoró reemplazando los ribonucleótidos por 2'-desoxirribonucleótidos dentro de la secuencia del tramo central de nucleótidos y el segundo tramo terminal de nucleótidos. En particular, reemplazando hasta seis ribonucleótidos por 2'-desoxirribonucleótidos en la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 se obtuvo como resultado una afinidad de unión mejorada para C5a humana por un factor de 3,5. Con más detalle, los inventores han descubierto sorprendentemente que:

- a) remplazando un ribonucleótido por un 2'-desoxirribonucleótido en las posiciones 4, 11, 12, 25 o 27, en el tramo central de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX- D19001 se obtuvo como resultado una afinidad de unión mejorada a C5a humana en comparación con la afinidad de unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 (véase la Figura 2; espiegelmberos NOX-D19001-D09, NOX-D19001-D16, NOX-D19001-D17, NOX-D19001-D30, NOX-D19001-D32);
- b) remplazando un ribonucleótido por un 2'-desoxirribonucleótido en la posición 1 en el segundo tramo terminal de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 se obtuvo como resultado una afinidad de unión a mejorada a C5a humana en comparación con la afinidad de unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 (véase la Figura 2; espiegelmberos NOX-D19001-D40);
- c) remplazando dos ribonucleótidos por dos 2'-desoxirribonucleótidos en las posiciones 4/25, 4/27 o 25/27 en el tramo central de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 dio como resultado una afinidad de unión mejorada a C5a biotinilada en comparación con la afinidad de unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 (véase la Figura 3; espiegelmberos NOX-D19001-D09-30, NOX-D19001-D09-32, NOX-D19001-D30-32);
- d) remplazando dos ribonucleótidos, en donde un ribonucleótido fue remplazado por un 2'-desoxirribonucleótido en la posición 1 en el segundo tramo terminal de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 y un ribonucleótido fue reemplazo por un 2'-desoxirribonucleótido en las posiciones de 4, 25 o 27 en el tramo central de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001, se obtuvo como resultado una afinidad de unión mejorada a C5a humana en comparación con la afinidad de unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 (véase la Figura 3; espiegelmberos NOX-D19001-D09-40, NOX-D19001-D30-40, NOX-D19001-D32-40);
- e) remplazando tres ribonucleótidos, en donde un ribonucleótido fue remplazado por un 2'-desoxirribonucleótido en la posición 1 en el segundo tramo terminal de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 y dos ribonucleótidos fueron reemplazados por dos 2'-desoxirribonucleótidos en la posición de 4/25, 4/27, 25/27 en el tramo central de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001,se obtuvo como resultado una afinidad de unión mejorada a C5a humana en comparación con la afinidad de unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 (véase la Figura 3; espiegelmberos NOX-D19001-D09-30-40, NOX-D19001-D09-D32-40, NOX-D19001-D30-32-40);
- f) remplazando tres ribonucleótidos, por tres 2'-desoxirribonucleótidos en las posiciones 04/25/27 en el tramo central de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001, se obtuvo como resultado una afinidad de unión mejorada a C5a biotinilada en comparación con la afinidad de unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 (véase la Figura 3; espiegelmero NOX-D19001-D09-30-32);
- g) remplazando cuatro ribonucleótidos, en donde un ribonucleótido fue remplazado por un 2'-desoxirribonucleótido en la posición 1 en el segundo tramo terminal de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 y tres ribonucleótidos fueron reemplazados por tres 2'-desoxirribonucleótidos en las posiciones 04/25/27 en el tramo central de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001, se obtuvo como resultado una afinidad de unión mejorada a C5a humana en comparación con la afinidad de unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 (véase la Figura 3; espiegelmero NOX-D19001-D09-30-32-40);

10

15

20

25

30

35

40

45

50

5 h) remplazando cinco ribonucleótidos, en donde un ribonucleótido fue remplazado por un 2'-desoxirribonucleótido en la posición 1 en el segundo tramo terminal de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 y cuatro ribonucleótidos fueron reemplazados por cuatro 2'-desoxirribonucleótidos en las posiciones 04/11/25/27 o 04/12/25/27 en el tramo central de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001, se obtuvo como resultado una afinidad de unión a mejorada a C5a humana en comparación con la afinidad de unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 (véase la Figura 3; espiegélmero NOX-D19001-D09-16-30-32-40, NOX-D19001-D09-17-30-32-40);

10 i) remplazando seis ribonucleótidos, en donde un ribonucleótido fue remplazado por un 2'-desoxirribonucleótido en la posición 1 en el segundo tramo terminal de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 y cinco ribonucleótidos fueron reemplazados por cinco 2'-desoxirribonucleótidos en las posiciones 04/11/12/25/27 en el tramo central de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001, se obtuvo como resultado una afinidad de unión mejorada a C5a humana en comparación con la afinidad de unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 (véase la Figura 3; espiegélmero NOX-D19001-D09-16-17-30-32-40 = NOX-D19001-6xDNA).

15 15 Basándose en los datos mostrados en los que se han remplazados los ribonucleótidos por 2'-desoxirribonucleótidos en varias posiciones del tramo central de los nucleótidos de las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a, conducidos a una unión mejorada a C5a, se puede resumir el tramo central de todas las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a analizadas en la siguiente fórmula:

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGKUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>RGGGHUGUKGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 61],

20 20 en donde n<sub>1</sub> es U o dU, n<sub>2</sub> es G o dG, n<sub>3</sub> es A o dA, n<sub>4</sub> es U o dU, n<sub>5</sub> es U o dU y G, A, U, C, H, K y R son ribonucleótidos, y dU, dG y dA son 2'-desoxirribonucleótidos,

en donde

a) en una realización preferida, el tramo central de los nucleótidos comprende la secuencia

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 62] (véase 274-B5-002); o

25 b) en una realización preferida, el tramo central de los nucleótidos comprende la secuencia

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 63] (véase 274-D5-002); o

c) en una realización preferida, el tramo central de los nucleótidos comprende la secuencia

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 64] (véase 274-C8-002); o

d) en una realización preferida, el tramo central de los nucleótidos comprende la secuencia

30 30 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 65] (véase NOX-D 19001); o

e) en una realización preferida, el tramo central de los nucleótidos comprende la secuencia

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 66] (véase 274C5-002); o

f) en una realización preferida, el tramo central de los nucleótidos comprende la secuencia

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGAUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 67] (véase 274-G6-002); o

35 g) en una realización preferida, el tramo central de los nucleótidos comprende la secuencia

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGCCUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 68] (véase 274-H6-002).

Las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a NOX-D19001-D09, NOX-D19001-D16, NOX-D19001-D17, NOX-D19001-D30, NOX-D19001-D32, NOX-D19001-D09-30, NOX-D19001-D09-32, NOX-D19001-D09-40, NOX-D19001-D30-32, NOX-D19001-D30-40, NOX-D19001-D32-40, NOX-D19001-D09-30-32, NOX-D19001-D09-30-40, NOX-

40 D19001-D09-32-40, NOX-D19001-D30-32-40, NOX-D19001-D09-30-32-40, NOX-D19001-D09-16-30-32-40, NOX-D19001-D09-17-30-32-40, NOX-D19001-D09-16-17-30-32-40 (véanse las Figura 2 y 3) mostraron la mejor afinidad de unión a C5a, y comprenden la siguiente secuencia para el tramo central de nucleótidos:

a) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 73] (véase NOX-D19001-D09, NOX-D19001-D09-40); o

45 b) 5' AUGUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 74] (véase NOX-D19001-D16); o

c) 5' AUGUGGUGGUdAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 75] (véase NOX-D19001-D17); o

- d) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 76] (véase NOX-D19001-D30, NOX-D19001-D30-40); o
- e) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 77] (véase NOX-D19001-D32, NOX-D19001-D32-40); o
- 5 f) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 78] (véase NOX-D19001-D09-30, NOX-D19001-D09-30-40); o
- g) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGdUCGACGCA 3'[SEQ ID NO: 79] (véase NOX-D 19001 -D09-32, NOX-D 19001 -D09-32-40);
- 10 h) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 80] (véase NOX-D19001-D30-32, NOX-D19001-D30-32-40); o
- i) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA 3'[SEQ ID NO: 81] (NOX-D19001-D09-30-32, NOX-D19001-D09-30-32-40); o
- j) 5' AUGdUGGUGGUdGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 82] (véase NOX-D19001-D09-16-30-32-40); o
- 15 k) AUGdUGGUGGUGdAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 83] (véase NOX-D19001-D09-17-30-32-40); o
- l) 5' AUGdUGGUGGUdGdAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA 3' [SEQ ID NO: 84] (véase NOX-D19001-D09-16-17-30-32-40 = NOX-D19001-6xDNA),

en donde G, A, U y C son ribonucleótidos, y dG, dA y dU son 2'-desoxirribonucleótidos.

20 La afinidad de unión de la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001 fue significativamente mejorada remplazando hasta uno hasta seis ribonucleótidos por 2'-deoxirribonucleótidos tal como se determina por la medida de resonancia de plasmón superficial, y se muestran como ejemplo para los ácidos nucleicos de unión a C5a, NOX-D19001-D09 y NOX-D19001-D09-16-17-30-32-40 (también denominado NOX-D19001-6xDNA) (Figura 6):

NOX-D19001:  $K_D$  de 1,38 nM,

25 NOX-D19001-D09:  $K_D$  de 709 pM,

NOX-D19001-D09-16-17-30-32-40:  $K_D$  de 361 pM.

30 NOX-D19001-6xDNA comprende un tramo central de nucleótidos con cinco 2'-desoxirribonucleótidos en lugar de ribonucleótidos, un primer tramo terminal de nucleótidos con cinco ribonucleótidos y un segundo tramo terminal de nucleótidos con cuatro ribonucleótidos y un 2'-desoxirribonucleótido. Sorprendentemente, los inventores pudieron mostrar que el primer y segundo tramo terminal de nucleótidos puede truncarse sin reducción de la afinidad para cuatro o tres nucleótidos. Tal como aquí se muestra, el primer y segundo tramo terminal de nucleótidos de NOX-D19001-6xDNA podría ser truncado de cinco a tres nucleótidos (véase NOX-D19001-6xDNA-020 también denominada NOX-D20001) reteniendo aún la afinidad (Figura 4A).

35 La Figura 4, demuestra la combinación satisfactoria de la sustitución de ribonucleótidos por 2'-desoxirribonucleótidos y truncamiento: La molécula madre de NOX-D19001-6xDNA y NOX-D19001-6xDNA-020 (también denominada NOX-D20001), NOX-D19001, que consiste en ribonucleótidos y un primer y un segundo tramo terminal de nucleótidos con cinco nucleótidos teniendo cada uno una afinidad de unión ( $K_D$ ) de 1,38 nM. Después de seis sustituciones de ribonucleótidos por 2'-desoxirribonucleótidos (que conduce a NOX-D19001-6xDNA) y el truncamiento en un primer y un segundo tramo terminal de nucleótidos con tres nucleótidos (que conduce a NOX-D19001-6xDNA-020, también denominada NOX-D20001) se mejoró la afinidad de unión a C5a humana en un factor mayor que cuatro (NOX-D20001,  $K_D$  de 0,3 nM). El truncamiento del primer o segundo tramo de nucleótidos en un nucleótido condujo a una actividad reducida, aunque dichas moléculas todavía se unen a C5a con un  $K_D$  inferior a 10 nM (véase la Figura 4A, 4B).

40 Otro ejemplo de sustitución satisfactoria de ribonucleótidos por 2'-desoxirribonucleótidos se muestra en la Figura 5. La molécula NOX-D19001-020 es un derivado truncado de NOX-D19001 y tiene una  $K_D$  de 11,3 nM (véase la Figura 5) en lugar de 1,38 nM tal como se determinó para NOX-D19001 (véanse las Figuras 1 y 2). Ambas moléculas comprenden el tramo central de ribonucleótidos idéntico, aunque NOX-D19001-020 comprende un primer tramo terminal de únicamente tres en lugar de cinco ribonucleótidos y un segundo tramo terminal de únicamente tres en lugar de cinco ribonucleótidos. Por la substitución de dos o tres ribonucleótidos por 2'-desoxirribonucleótidos en el tramo central de nucleótidos y opcionalmente de un ribonucleótido por 2'-desoxirribonucleótido en el segundo tramo terminal de nucleótidos se puede mejorar la afinidad de unión de NOX-D19001-020 por un factor mayor de 10 (véase la Figura 5, NOX-D19001-2xDNA-020, NOX-D19001-3xDNA-020, NOX-D19001-2dU-1dC-020 también denominadas NOX-D21001, NOX-D19001-3dU-1dC-020).

Tomados juntos, los primeros y segundos tramos terminales de las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a, comprenden uno, dos, tres, cuatro o cinco nucleótidos (Figura 1 a Figura 5), por lo que los tramos se hibridan opcionalmente entre sí, por lo que, tras la hibridación, se forma una estructura bicatenaria. Esta estructura bicatenaria puede consistir en uno a cinco pares de bases. Sin embargo, dicha hibridación no se da necesariamente en la molécula.

Analizando el primer tramo terminal de nucleótidos y el segundo tramo terminal de nucleótidos de todas las moléculas s de ácidos nucleicos de unión a C5 analizadas, la fórmula genérica para el primer tramo terminal de nucleótidos es 5' Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub>Z<sub>4</sub>G 3' y la fórmula genérica para el segundo tramo terminal de los nucleótidos es 5' Z<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>Z<sub>7</sub>Z<sub>8</sub>Z<sub>9</sub> 3',

10 en donde

Z<sub>1</sub> es G o está ausente, Z<sub>2</sub> es S o está ausente, Z<sub>3</sub> es S o está ausente, Z<sub>4</sub> es B o está ausente, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V o está ausente Z<sub>7</sub> es S o está ausente, Z<sub>8</sub> es S o está ausente, Z<sub>9</sub> es C o está ausente, y

G, S, B, C, V son ribonucleótidos, y dC es un 2'-desoxirribonucleótido,

con lo que en una primera realización preferida:

- 15 a) Z<sub>1</sub> es G, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> es C, o
- b) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub>, es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> está ausente, o
- c) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o
- d) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o
- e) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> es C, o
- f) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> es C, o
- g) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> es C, o
- h) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> está ausente, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> es C, o
- i) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> está ausente, o
- j) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> está ausente, o
- k) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> está ausente, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S, Z<sub>9</sub> está ausente, o
- l) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o
- m) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o
- n) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> está ausente, Z<sub>5</sub> es C, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o
- o) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o
- p) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente, o
- q) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> está ausente, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente, Z<sub>9</sub> está ausente;

en una segunda realización preferida:

- a) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos 5' GCCUG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CAGGC 3', o

- b) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCCUG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAGGC 3', o
- 5 c) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CCUG 3' o 5' CUG 3' o 5' UG 3' o 5' G 3', y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAGGC 3', o
- d) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCUG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAGC 3', o
- e) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCGGC 3', o
- 10 f) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GGCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCGCC 3', o
- g) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CUG 3' o 5' UG 3' o 5' CG 3' o 5' G 3', y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAGC 3', o
- 15 h) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCUG 3', y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAC 3' o 5' dCC 3' o 5' dCA 3', o
- i) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GUG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCAC 3', o
- 20 j) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' UG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCA 3', o
- k) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCGC 3', o
- 25 l) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCGC 3', o
- m) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' G 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCGC 3', o
- n) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCC 3', o
- 30 o) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dC 3', o
- p) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' dCC 3', o
- q) el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' GCG 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' CGC 3'.
- 35 Con el fin de averiguar su funcionalidad, las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19001, NOX-D20001 y NOX-D21001 fueron sintetizadas como un espiegélmero que comprendía un grupo amino en su extremo 5'. A dichos espieglémeros modificados por amino, se acopló un resto de PEG de 40 kDa que conducía a los espiegélmeros de unión a C5a, NOX-D19, NOX-D20 y NOX-D21. La síntesis y PEGilación de los espiegélmeros se describen en el Ejemplo 2.
- 40 El efecto de la afinidad de unión mejorada podría mostrarse para la funcionalidad de las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a. Tal como se determina mediante un ensayo de quimiotaxis (Ejemplo 5), la molécula de ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19 ( $IC_{50} = 1,9$  nM) que consistía exclusivamente en ribonucleótidos fue menos potente para inhibir la función de C5a humana que la NOX-D20, una molécula de ácido nucleico de unión a C5a derivada de NOX-D19 que comprende seis sustituciones de ribonucleótido por 2'-desoxirribonucleótido ( $IC_{50} = 0,28$  nM) (Figura 7).
- 45 NOX-D20 mostró una afinidad muy alta de unión a C5a de múrido con una constante de disociación  $K_D$  de 19 pM, mientras que para C5a humana se determinó un  $K_D$  de 299 pM (Ejemplo 4, Figura 8). NOX-D20 inhibe la función de C5a humana con una constante de inhibición  $IC_{50}$  de 275 pM tal como se determina mediante ensayo de quimiotaxis (Ejemplo 5, Figura 7 y 12 A). Por razones estequiométricas, la sensibilidad de los ensayos de quimiotaxis para C5a de ratón se limita a 150 pM debido a la concentración estimuladora de C5a de ratón de 300 pM. Por consiguiente, para C5a de ratón, se midió una  $IC_{50}$  de 140 pM para NOX-D20 (Ejemplo 5, Figura 12 A).

NOX-D20 no mostró unión a C5a de rata o de mono Rhesus, lo que indica una especificidad de diana muy alta (Figura 8). A partir de la alineación de secuencias de polipéptido de C5a humana, de ratón, de rata y de mono Rhesus y la especificidad determinada, es más probable que los residuos de serina 16 y valina 28 de C5a humana, sean residuos esenciales de unión en C5a (Figura 11). Estos se conservan en C5a humana y de múrido, pero son diferentes en C5a de mono Rhesus y de rata.

NOX-D21 contiene sitios de mejora de afinidad mejores que NOX-D20, y mostró una alta afinidad para C5a humana y de múrido tal como se muestra mediante una medida en Biacore ( $K_D$  (C5a de múrido) = 29 pM,  $K_D$ (C5a humana) = 815 pM,  $K_D$ (C5 humana) = 413 pM, véase la Figura 11). NOX-D21 inhibe la función de C5a humana con una constante de inhibición  $IC_{50}$  de 476 pM, tal como se determina por un ensayo de quimiotaxis (Ejemplo 5, Figura 12B).

- 5 10 *In vivo* se genera una versión truncada de C5a por escisión enzimática del residuo de arginina C-terminal, conocida como des-Arg-C5a (también denominada C5a<sub>desArg</sub>). La función biológica de des-Arg-C5a no se entiende completamente, pero existe evidencia de que des-Arg-C5a retiene las funciones de activación de leucocitos. Por consiguiente, se investigó si NOX-D20 también se une a des-Arg-C5a. NOX-D20 mostró una unión, dependiente de la dosis, a des-Arg-C5a humana recombinante inmovilizada (Figura 9).
- 15 20 La evaluación cinética detallada, tal como se describe, mostró que des-Arg-C5a humana es unida por NOX-20 con afinidad comparable a la C5a humana de longitud total con una constante de disociación de 316 pM y 299 pM, respectivamente. NOX-D21 se une a des-Arg-C5a de ratón y humana con constantes de disociación de 28 pM y 854 pM, respectivamente (Figura 10). Por lo tanto, incluso después de la escisión de C5a a des-Arg-C5a, las moléculas de ácido nucleico de unión a C5a tales como NOX-20 y NOX-D21 todavía se unen a sus dianas.
- 25 30 Sorprendentemente NOX-D20 y NOX-D21 también mostraron unión a C5 purificada de plasma de humano con una afinidad de 164 pM y 413 pM, respectivamente (Figuras 9 y 10). Este fenómeno puede no ser previsto. Sin embargo, es plausible puesto que C5a es una parte de C5 que es separada por escisión por la C5 convertasa cuando se activa el sistema del complemento o por trombina u otros miembros de un sistema de coagulación activado. Además, la C5 purificada de plasma humano lleva la estructura de glicosilación natural en la asparagina 64. La glicosilación no había estado presente en el polipéptido C5a de imagen espectral de múridos que se utilizó para la identificación de NOX-D19, NOX-D20, NOX-D21 y otras moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.
- La unión a C5 puede influir en la farmacocinética debido a la baja eliminación esperada de la proteína C5 grande y una concentración en plasma publicada de 350-390 nM. La unión a C5 también puede influir en la farmacodinámica. C5 se une por moléculas de ácido nucleico de unión a C5a, tales como NOX-20 y NOX-D21 y por lo tanto C5a ya está bloqueada por el espiegélmero antes de liberarse, y puede conducir a la señalización del receptor.

#### Ejemplo 2: Síntesis y derivatización de aptámeros y espiegélmeros

##### Síntesis a pequeña escala

- 35 Se produjeron aptámeros (ácidos nucleicos D-RNA) y espiegélmeros (ácidos nucleicos L-RNA) por síntesis en fase sólida con un sintetizador ABI 394 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.) utilizando química de 2'TBDMS RNA fosforamidita (Damha and Ogilvie, 1993). rA(N-Bz)-, rC(Ac)-, rG(N-ibu)-, y rU-fosforamiditas en la configuración D y L se compraron a ChemGenes, Wilmington, MA. Los aptámeros y espiegélmeros fueron purificados por electroforesis en gel.

##### Síntesis a gran escala más modificación

- 40 45 50 Se produjeron espiegélmeros por síntesis en fase sólida con un sintetizador ÄctaPilot100 (Amersham Biosciences; General Electric Healthcare, Freiburg), utilizando química de 2'TBDMS RNA de fosforamidita (Damha and Ogilvie, 1993). L-rA(N-Bz)-, L-rC(Ac)-, L-rG(N-ibu)- y L-rU-fosforamiditas se compraron a ChemGenes, Wilmington, MA. Se compró el modificador 5'-amino a American International Chemicals Inc. (Framingham, MA, USA). La síntesis del espiegélmero no modificado o modificado en 5'-amino se inició en CPG modificado por L-riboG, L-riboC, L-riboA o L-riboU tamaño de poros 1000 Å (Link Technology, Glasgow, UK). Para el acoplamiento (15 minutos por ciclo), se utilizó benciltiotetrazol 0,3 M (CMS-Chemicals, Abingdon, UK) en acetonitrilo y 3,5 equivalentes de la solución de fosforamidita 0,1 M respectiva en acetonitrilo. Se utilizó un ciclo de oxidación-protección. Los disolventes y reactivos estándares adicionales para la síntesis de oligonucleótidos se compraron a Biosolve (Valkenswaard, NL). Se sintetizó el espiegélmero DMT-ON; después de la desprotección, se purificó mediante RP-HPLC preparativa (Wincott et al., 1995) utilizando el medio Source15RPC (Amersham). El grupo 5'DMT se eliminó con ácido acético al 80% (30 minutos a temperatura ambiente). Subsecuentemente, se añadió una solución acuosa de NaOAc 2 M y el espiegélmero se desalificó mediante filtración de flujo tangencial utilizando una membrana de celulosa regenerada 5 K (Millipore, Bedford, MA).

##### PEGilación de espiegélmeros

- 55 Con el objeto de prolongar *in vivo* el tiempo de permanencia en plasma de los espiegélmeros, dichos espiegélmeros fueron acoplados covalentemente a un resto de polietilenglicol (PEG) de 40 kDa en el extremo 5'.

Para PEGilación (para detalles técnicos del método para PEGilación véase la solicitud de patente europea EP 1306382), se disolvió el espiegélmero modificado en 5'-amino purificado en una mezcla de H<sub>2</sub>O (2,5 mL), DMF (5 mL) y tampón A (5 mL; preparado mezclando ácido cítrico • H<sub>2</sub>O [7 g], ácido bórico [3,54 g], ácido fosfórico [2,26 mL] y NaOH 1 M [343 mL] y añadiendo agua hasta un volumen final de 1 L; el pH = 8,4 se ajustó con HCl 1 M).

- 5 El pH de la solución del espiegélmero se llevó hasta 8,4 con NaOH 1 M. Posteriormente, se añadió éster de PEG-NHS de 40 kDa (Jenkem Technology, Allen, TX, USA) a 37°C cada 30 minutos en seis porciones de 0,25 equivalentes hasta que se alcanzó un rendimiento máximo del 75 al 85%. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo en 8-8,5 con NaOH 1 M durante la adición del éster PEG-NHS.
- 10 La mezcla de reacción se mezcló con 4 mL de solución de urea (8 M) y 4 mL de tampón B (acetato de trietilamonio 0,1 M en H<sub>2</sub>O) y se calentó a 95°C durante 15 minutos. Posteriormente se purificó el espiegélmero PEGilado por RP-HPLC con un medio Source 15RPC (Amersham), utilizando un gradiente de acetonitrilo (tampón B; tampón C: acetato de trietilamonio 0,1 M en acetonitrilo). PEG en exceso eluido en el tampón C al 5%, espiegélmero PEGilado en tampón C al 10-15%. Las fracciones del producto con una pureza >95% (tal como se evalúa mediante HPLC) se combinaron y mezclaron con 40 mL de NaOAc 3 M. El espiegélmero PEGilado se desalificó mediante filtración de flujo tangencial (membrana de celulosa regenerada de 5 K, Millipore, Bedford MA).
- 15

#### **Ejemplo 3: Determinación de constantes de unión a C5a para aptámeros (ensayo pull-down)**

##### **Ensayo de pull-down directo**

La afinidad de los ácidos nucleicos de unión a C5a se midió como la unión de aptámeros (ácidos nucleicos D-RNA) a D-C5a biotinilada de ratón (SEQ. ID. 89) en un formato de ensayo *pull-down* a 37°C. Los aptámeros se etiquetaron con 5'-fosfato mediante polinucleótido-quinasa de T4 (Invitrogen) utilizando ATP marcado con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] (Hartmann Analytic, Braunschweig, Alemania). La radiactividad específica de los aptámeros marcados fue 200.000 – 800.000 cpm/pmol. Los ensayos se llevaron a cabo en tampón de selección (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; KCl 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; 4 U/mL de inhibidor de RNasa (RNaseOUT, Invitrogen); 0,1% [p/vol] de Tween-20 suplementado con 50 µg/mL de seroalbúmina bovina (Sigma) y 10 µg/mL de espiegélmero no específico con el objeto de evitar la absorción de las parejas de unión con superficies de utensilios de plástico utilizados o la matriz de inmovilización). Los aptámeros se incubaron después de la des- y re-naturalización en una concentración de 0,2-1 nM a 37°C en tampón de selección junto con cantidades variables de D-C5a biotinilada de ratón durante 3-4 horas con el objeto de alcanzar el equilibrio en bajas concentraciones. El intervalo de concentración de D-C5a biotinilada de ratón se ajustó desde 640 pM a 10 µM; el volumen de reacción total fue 80-200 µL. El D-C5a biotinilada de ratón y los complejos de aptámero y D-C5a biotinilada de ratón se inmovilizaron en partículas de NeutrAvidin Agarose Plus de 5 µL (Pierce Biotechnology) que habían sido preequilibradas con tampón de selección. Las partículas se mantuvieron en suspensión durante 30 minutos a 37°C en un termomezclador. Se cuantificó la radiactividad inmovilizada en un contador de centelleo después de separar el líquido sobrenadante y lavado adecuado. El porcentaje de unión se representó gráficamente frente a la concentración de D-C5a biotinilada de ratón, y se obtuvieron las constantes de disociación utilizando algoritmos informáticos (GraphPad Prism) suponiendo una estequiometría 1:1.

##### **Ensayo pull-down competitivo**

Con el objeto de comparar diferentes ácidos nucleicos de unión a D-C5a, se llevó a cabo un ensayo de clasificación competitivo. Para este propósito, el aptámero más afín disponible fue marcado radiactivamente (véase anteriormente) y sirvió como referencia. Después de la des- y re-naturalización se incubó en tampón de selección a 37°C con D-C5a biotinilada de ratón en condiciones que dieron como resultado aproximadamente del 5 al 10% de unión a D-C5a biotinilada de ratón después de inmovilización y lavado en 4 µL de partículas de NeutrAvidin Agarose Plus (Pierce Biotechnology) sin competición. Se añadió un exceso de variantes de aptámero D-RNA no marcados des- y re-naturalizados en concentraciones que fluctúa de 9 pM-400 nM con el aptámero de referencia marcado para reacciones de unión paralelas; el volumen de reacción total fue 160-400 µL. Después de 3-4 horas de incubación, se inmovilizaron la D-C5a biotinilada de ratón y los complejos de aptámero y los ensayos se analizaron tal como se describió anteriormente. Los aptámeros que han de ser analizados compitieron con el aptámero de referencia para unión a la diana, disminuyendo de esta forma la señal de unión que depende de sus características de unión. El aptámero que se encontró como el más activo en este ensayo, podría servir luego como una nueva referencia para análisis comparativos de variantes de aptámeros adicionales.

#### **Ejemplo 4: Medida en Biacore de espiegélmeros que se unen a C5a y péptidos relacionados**

El instrumento se ajustó a una temperatura constante de 37°C. El instrumento Biacore 2000 se limpió utilizando el método DESORB antes de iniciar cada experimento/inmovilización de un nuevo chip. Después de acoplar un chip de mantenimiento, el instrumento se imprimó consecutivamente con solución de DESORB 1 (dodecilsulfato de sodio al 0.5%, SDS), solución de DESORB 2 (glicina 50 mM, pH 9.5) y tampón HBS-EP. Finalmente, el sistema se imprimó con tampón HBS-EP.

Para experimentos en Biacore, se prepararon espiegélmeros de unión a C5a en agua estéril con una concentración de 100 µM.

Se imprimió el chip CM5 con tampón HBS-EP y se equilibró hasta que se observó una línea de base estable. Las celdas de flujo se inmovilizaron comenzando desde la célula de flujo 4 hasta la celda de flujo 1. Se inyectaron 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla 1:1 de EDC 0,4 M y NHS 0,1 M utilizando el comando QUICKINJECT con un caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La activación de la celda de flujo se monitorizó un incremento de RU después de inyección de NHS/ EDC (normalmente

5 150 - 500 RU para chips CM5). Soluciones de 0,1 - 1  $\mu\text{M}/\text{L}$  en NaAc 10 mM pH 5,5 para C5a o NaAc 10 mM pH 5,5 para C5 humana, se transfirieron a un vial y se inyectaron utilizando el comando MANUALINJECT con un caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Se inmovilizaron 1000-3000 RU en el chip. Todas las celdas de flujo se bloquearon posteriormente con 10 15 una inyección de 70  $\mu\text{L}$  de hidrocloruro de etanolamina 1 M, pH 8 a un caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La inyección de 30  $\mu\text{L}$  de la solución de regeneración (NaCl 1 M) a un caudal de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  se llevó a cabo para eliminar la proteína unida de forma no específica desde la superficie del chip.

Los parámetros cinéticos y las constantes de disociación se evaluaron por una serie de inyecciones de espiegélmeros en concentraciones de 2.000 – 1.000 - 500 - 200 - 125 – 62,5 – 31,3 – 15,6 (2x) – 7,8 -3,9 – 1,95 - 0,98 – 0,48 – 0,24 – 0,12 - 0 nM diluidas en tampón de migración, comenzando con la concentración más baja. En todos los experimentos, el análisis se llevó a cabo a 37°C utilizando el comando Kinject que define un tiempo de 15 asociación de 240 y un tiempo de disociación de 240 segundos a un caudal de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ . El ensayo fue referenciado doblemente, mientras que FC1 sirvió como el control de superficie (bloqueado) (contribución global de cada concentración de espiegélmero) y una serie de inyecciones de tampón sin analito determinó la concentración global del propio tampón. Se inyectó al menos una concentración de espiegélmero dos veces para monitorizar la eficacia de regeneración y la integridad del chip durante los experimentos. La regeneración se llevó a cabo 20 inyectando 60  $\mu\text{L}$  de NaCl 1M a un caudal de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ . El tiempo de estabilización de la línea base después de cada ciclo de regeneración se ajustó a 1 minuto en 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Los análisis de datos y el cálculo de las constantes de disociación ( $K_d$ ) se llevaron a cabo con el programa informático BIAevaluation 3.1.1 (BIACORE AB, Uppsala, Suecia) utilizando un algoritmo de ajuste estequiométrico Langmuir 1:1 modificado, con un RI constante y evaluación de transferencia de masa con un coeficiente de 25 transporte de masa  $k_t$  de  $1 \times 10^7 [\text{RU}/\text{M}^*\text{s}]$ .

#### **Ejemplo 5: Determinación de la concentración inhibidora en un ensayo de quimiotaxis**

##### **Generación de una línea celular que expresa el receptor para C5a humana**

Se generó una línea celular transfectada establemente que expresaba el receptor humano para C5a transfectando 30 células pro B de ratón BA/F3 con un plásmido que codifica el receptor para C5a humana (acceso en NCBI NM\_001736 en pcDNA3.1+). Las células que expresan C5aR se seleccionaron mediante tratamiento con geneticina y se analizaron para determinar la expresión con RT-PCR y para la funcionalidad con ensayo de quimiotaxis.

##### **Ensayo de quimiotaxis**

El día previo al experimento, las células se sembraron en un nuevo matraz a  $0.3 \times 10^6/\text{mL}$ . Para el experimento, las 35 células se centrifugaron, se lavaron una vez con HBH (HBSS, que contiene 1 mg/mL de seroalbúmina bovina y HEPES 20 mM) y se volvieron a poner en suspensión en  $1,33 \times 10^6$  células/mL. Se añadieron 75  $\mu\text{L}$  de esta suspensión a los compartimentos superiores de una placa Corning Transwell de 96 pocillos con poros de 5  $\mu\text{m}$  (Costar Corning, #3388; NY, USA.). En los compartimentos inferiores se preincubó C5a humana (SEQ.ID. 50) o C5a de ratón (SEQ.ID. 54) recombinantes junto con espiegélmeros en varias concentraciones en 235  $\mu\text{L}$  de HBH a 37°C durante 20 a 30 minutos antes de la adición de las células. Las células se dejaron migrar a 37°C durante 3 horas. 40 Posteriormente, se retiró la placa del inserto (compartimentos superiores) y se añadieron a los compartimentos inferiores 30  $\mu\text{L}$  de resazurina 440  $\mu\text{M}$  (Sigma, Deisenhofen, Alemania) en solución salina tamponada con fosfato. Después de la incubación a 37°C durante 2,5 horas, se midió la fluorescencia en una longitud de onda de excitación de 544 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

45 Los valores de fluorescencia se corrigieron por la fluorescencia de fondo (sin C5a en el pocillo) y se representaron gráficamente frente a la concentración de espiegélmero. Los valores de IC<sub>50</sub> se determinaron con regresión no lineal (ajustada a 4 parámetros) utilizando GraphPad Prism. Alternativamente, el valor para la muestra sin espiegélmero (C5a únicamente) se ajustó a 100% y los valores para las muestras con espiegélmero se calcularon como su porcentaje. Los valores del porcentaje se representaron frente a la concentración de espiegélmero y los valores de IC<sub>50</sub> se determinaron tal como se describió anteriormente.

##### **50 Determinación de la concentración eficaz del 50% (EC<sub>50</sub>) para C5a humana y de ratón**

Después de 3 horas de migración de las células BA/F3/huC5aR hacia varias concentraciones de C5a humana o C5a de ratón, se obtuvieron las curvas de dosis-respuesta para C5a humana y de ratón, indicando concentraciones eficaces al 50% (EC<sub>50</sub>) de 0,1 nM para huC5a y 0,3 nM para mC5a. Para los experimentos de inhibición de quimiotaxis por espiegélmeros, se utilizaron C5a humana 0,1 nM y C5a de ratón 0,3 nM.

**Ejemplo 6: Inhibición de activación inducida por C5a de neutrófilos humanos primarios****Aislamiento de PMN humanos**

Se aislaron leucocitos polimorfonucleares (PMN) a partir de sangre total mediante centrifugación en gradiente discontinua a temperatura ambiente. Se recogió sangre en tubos de recogida sangre (Sarstedt) que contenían ácido citrato-dextrosa. Se añadió dextrano 500 (Accurate Chemical) hasta una concentración final de 2% p/v y la sangre/dextrano se extendió en capas sobre Histopaque (1,077 g/mL, Sigma). Después de centrifugación se desecharon todo el líquido y las células por encima de la interfase del gradiente. Se recogió el sedimento y aproximadamente 80% del líquido restante superior, y se diluyeron 1:1 con una mezcla de Voluven al 80% v/v (Fresenius Kabi), PBS al 16% v/v (Sigma) y ACD al 4% v/v (Sigma). La mezcla se centrifugó a 400 rpm durante 15 minutos. El líquido sobrenadante se recogió y se centrifugó a 1.000 rpm durante 7 minutos. El sedimento se volvió a poner en suspensión suavemente y los eritrocitos restantes se eliminaron por lisis.

**Inhibición de quimiotaxis inducida por C5a de PMN humanos**

Se preincubó C5a humana (1 nM) con las concentraciones indicadas de NOX-D19 o NOX-D20 en HBSS + 0,01% de BSA + HEPES 25 mM en la cámara inferior de una placa de quimiotaxis. Se añadieron neutrófilos humanos a las cámaras superiores de una placa de quimiotaxis, y se llevó a cabo la quimiotaxis durante 25 minutos a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación la cámara superior se ajustó a una placa de luminiscencia blanca que contenía Accutase para recoger células unidas a la parte inferior de la malla de quimiotaxis. Se añadió reactivo Glo (Promega) y se equilibró durante 10 minutos. La luminiscencia se midió utilizando un lector de placas Biotek Synergy 2.

**Inhibición de liberación de elastasa inducida por C5a por PMN humanos.**

Se imprimaron neutrófilos humanos con TNF $\alpha$  (10 ng/mL) y citocalasina B (5  $\mu$ g/mL) durante 30 minutos a 37 °C, CO<sub>2</sub>. Al 5%. Las células se estimularon durante 45 minutos con C5a humana (30 nM) que había sido incubada previamente con NOX-D19 o NOX-D20 en las concentraciones indicadas. Posteriormente las células se separaron mediante centrifugación y se incubaron 25  $\mu$ L del líquido sobrenadante con sustrato de elastasa (Calbiochem) en Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 durante 1 hora a 37°C tomándose las lecturas a una absorbancia de 405 nm cada 5 minutos. Los datos cinéticos se analizaron para determinar  $v_{max}$  para cada muestra. El porcentaje medio de la actividad de elastasa relativo al control, se calculó para cada muestra (sin restar el fondo).

**Resultados**

NOX-D19 y NOX-D20 inhiben eficazmente la activación de PMN de sangre periférica humana aislada recientemente por C5a. NOX-D19 o NOX-D20 10 nM fueron suficientes para bloquear más del 85% de la quimiotaxis inducida por huC5a de PMN humanos (Figura 13 A). La liberación inducida por HuC5a de elastasa antimicrobiana fue inhibida suficientemente por NOX-D19 y NOX-D20 (Figura 13 B). NOX-D19 o NOX-D20 30 nM suprimieron aproximadamente el 50% de liberación de elastasa inducida por C5a. Debe observarse, que por razones estequiométricas la sensibilidad de este ensayo está limitada a IC<sub>50</sub> = 15 nM, ya que la liberación de elastasa es inducida por huC5a 30 nM.

**Ejemplo 7: Los ácidos nucleicos de unión a C5a no interfieren con hemólisis dependiente del complemento**

El producto final de la cascada del complemento es el complejo de ataque a membranas (MAC), un poro que consiste en C5b-9. Se considera que MAC se inserta en las membranas citoplásmicas de patógenos y los extermina mediante inducción de fuga citoplásmica.

Los ácidos nucleicos de unión a C5a (espiegélmeros) aquí presentados, han mostrado reconocer C5a en el contexto de C5 (véase el Ejemplo 1, Figuras 9 y Figuras 10). Por consiguiente, se investigó si la escisión de C5 en las anafilatoxinas C5a y C5b, que es parte de MAC, es inhibida por estos espiegélmeros. Esto se logró utilizando un ensayo de hemólisis de eritrocitos de oveja dependiente del complemento.

**Métodos**

Se preincubó suero liofilizado humano reconstituido ("Human Complement Serum" (Sigma Aldrich, Alemania)) con los espiegélmeros PEGilados NOX-D19, NOX-D20 y NOX-D21 en el intervalo de 10 nM a 10.000 nM en placas de 96 pocillos (Nunc-Immuno™ Plate, MaxiSorp Surface™). Como un control positivo, el aptámero de unión a C5, C5C6 con sustitución máxima de 2'OMe purina y 2'fluoro pirimidina (Biesecker et al., 1999) (sintetizado en su laboratorio) que inhibe la escisión de C5, se utilizó en el mismo intervalo de concentración. Como un control para los efectos de espiegélmeros no específicos potenciales en los espiegélmeros PEGilados del ensayo con una secuencia inversa de NOX-D19 y NOX-D21, se incluyeron revNOX-D19 y revNOX-D21. Se mostró en forma más fácil que revNOX-D19 y revNOX-D21 no inhibió C5a en ensayos en Biacore y basados en células. Después de 1 hora de incubación a 37°C, se añadieron eritrocitos de oveja opsonizados con anticuerpos de eritrocitos anti-oveja de conejo, conocidos como sistema hemolítico (Institut Virion/Serion GmbH, Alemania) a la mezcla de inhibidor del complemento de suero incubada previamente. El complemento se activó por la vía clásica conduciendo a la escisión de C5 en C5a y C5b. Posteriormente C5b se asocia con C6-C9 para formar el complejo de ataque a

membranas (MAC) lítico. La hemólisis de eritrocitos de oveja debido a la formación de MAC se determinó 30 minutos después por una medida colorimétrica después de sedimentación de las células intactas. Cuanto mayor es el grado de hemólisis mayor es la absorción a 405 nm (medida en un lector de placas Fluo Star).

## **Resultados**

- 5 El aptámero C5C6 inhibió la lisis dependiente del complemento de los eritrocitos de oveja con una IC<sub>50</sub> de aproximadamente 1 μM (Figura 14 A, B). Los espiegélmeros ensayados, es decir los ácidos nucleicos de unión a C5 y C5a, NOX-D19 y NOX-D20 (Figura 14A) y NOX-D21 (Figura 14 B) y los espiegélmeros sin unión a C5 o C5a, revNOX-D19 (Figura 14 A) y revNOX-D21 (Figura 14 B) no inhibieron la hemólisis.

## **Deliberación**

- 10 Los espiegélmeros de unión a C5a ensayados mostraron no inhibir la formación de MAC y por consiguiente son antagonistas selectivos únicamente de C5a. Si se utilizan como medicina, esto puede ser conveniente ya que la inhibición de la formación de MAC puede comprometer el mecanismo de defensa del cuerpo contra los patógenos invasores, principalmente las bacterias Gram-negativas.

15 **Ejemplo 8: El ácido nucleico de unión a C5a, NOX-D19, muestra eficacia en el modelo de ligamiento y punción cecal de múridos para septicemia polimicrobiana**

El efecto de inyecciones intraperitoneales de NOX-D19 durante el curso de septicemia polimicrobiana, se analizó en un modelo de ligamiento y punción cecal (CLP) de roedores.

## **Métodos**

### **Modelo animal**

- 20 Se utilizaron para el estudio ratones C57BL/6 machos de 10 a 12 semanas (Charles River Laboratories, Alemania). Se indujo quirúrgicamente peritonitis bajo anestesia ligera con isoflurano. Se realizaron incisiones en el cuadrante superior izquierdo de la cavidad peritoneal (ubicación normal del ciego). El ciego se expuso y se colocó un ligamiento apretado alrededor del ciego con suturas distales a la inserción del intestino delgado (se ligó el 75%). Se realizó una herida por punción en el ciego con una aguja de calibre 24 y se expresaron pequeñas cantidades de contenidos cecales a través de la herida. El ciego se reemplazó en la cavidad peritoneal y se cerró el sitio con laparotomía. Se administraron 500 μL s.c. de solución salina como reemplazo de fluido. Los animales de simulación pasaron por el mismo procedimiento excepto por el ligamiento y la punción del ciego. Finalmente, los animales se devolvieron a sus jaulas con acceso libre a alimento y agua.

### **Grupos de estudio**

- 30 Se analizaron 4 grupos (n = 6 ratones para cirugía de simulación n=10 ratones por grupo para cirugía CLP): (1) cirugía de simulación con tratamiento con vehículo (solución salina), (2) cirugía CLP con tratamiento con vehículo, (3) cirugía CLP con tratamiento con NOX-D19 en dosis baja (1 mg/kg) y (4) cirugía CLP con tratamiento con NOX D19 de dosis alta (10 mg/kg). Los investigadores estuvieron desconocían la estrategia del tratamiento y no sabían que compuesto contenía el vehículo o el producto de tratamiento. La vía de administración fue i.p. cada día durante 35 6 días comenzando en el omento de la cirugía CLP.

### **Supervivencia**

Se hizo un seguimiento de 7 días en cada grupo. Los ratones fueron monitorizados diariamente y se generaron curvas de supervivencia de Kaplan Meier utilizando el programa informático GraphPad Prism 4.

### **Extracción de sangre**

- 40 Se obtuvieron muestras de sangre bajo anestesia ligera con éter a partir del seno cavernoso con una capilar antes de la cirugía (línea base, día -4) y el día 1 después de la cirugía para permitir la medición de los marcadores habituales en suero de la lesión de riñón aguda (creatinina en suero, y nitrógeno de urea en sangre, BUN) y e insuficiencia hepática aguda (alanina-aminotransferasa en suero, ALT en suero). El nivel de aspartato-aminotransferasa (AST en suero) se midió en suero como un marcador de insuficiencia multiorgánica. La medida de los parámetros de química clínica se llevó a cabo en un analizador Olympus (AU400).

### **Estadística**

Se calculó la significación estadística por el ensayo T de Student. Para la supervivencia, se generaron curvas de Kaplan de Meier y se llevó a cabo un ensayo de rango logarítmico para la significación. Se utilizó el programa informático GraphPad Prism 4.

## Resultados

### **Supervivencia**

Tal como se esperaba, no ocurrió mortalidad en animales con cirugía simulada sin CLP (Figura 15). En ratones que recibieron cirugía CLP y que fueron tratados únicamente con vehículo, la supervivencia mediana fue 1,5 días. El tratamiento con NOX-D19 después de cirugía CLP mejoró la supervivencia mediana (figura 15). Los ratones tratados con bajas dosis de NOX-D19 (1 mg/kg), mostraron supervivencia mediana más larga (5 días,  $p < 0,0001$  frente al vehículo). Los ratones tratados con NOX-D19 en dosis alta (10 mg/kg) tuvieron una supervivencia mediana de 3 días la cual fue significativamente larga que en ratones tratados con vehículo ( $p = 0,0401$ ), pero no fue significativamente diferente a la del tratamiento con NOX-D19 de dosis baja ( $p = 0,4875$ ). El 100% de los ratones tratados con vehículo murieron a los 4 días después de cirugía CLP. La mortalidad del 100% y 90% ocurrió no antes de 7 días en ratones tratados con dosis bajas y altas de NOX-D19, respectivamente (Figura 15).

### **Química clínica**

#### **Función renal**

La concentración de creatinina en suero y nitrógeno de urea en sangre (BUN) son parámetros para la función renal. La función renal se evalúo antes del comienzo del estudio (día -4) y el día 1 después de cirugía CLP.

El día 1, la CLP indujo un aumento significativo en los niveles de creatinina en suero en ratones tratados con vehículo. El tratamiento con baja dosis de NOX-D19 (1 mg/kg) evitó este aumento (Figura 16 A). En los ratones tratados con NOX-D19 con dosis alta (10 mg/kg), se observó un aumento moderado, aunque estadísticamente no significativo en los niveles de creatinina en suero ( $p = 0,1873$  frente al vehículo) (Figura 16 A).

BUN (Figura 16 B), que es un parámetro más sensible de la función renal que la creatinina, aumentó significativamente el día 1 después de cirugía CLP en ratones tratados con vehículo. El tratamiento de los ratones con baja y alta dosis de NOX-D19, suprimió significativamente el aumento de BUN tras la CLP (Figura 16 B).

#### **Función hepática**

El marcador más fiable de lesión o necrosis hepatocelular, es la alanina-aminotransferasa en suero (ALT en suero). Todos los grupos mostraron un aumento de ALT en suero el día 1 después de la cirugía CLP. Sin embargo, ambos grupos de ratones sépticos tratados con NOX-D19, demostraron una función hepática mejorada en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 17 A).

#### **Insuficiencia multiorgánica**

El nivel en suero de aspartato-aminotransferasa (AST en suero) (Figura 17 B) se midió como un marcador de insuficiencia multiorgánica, puesto que se había demostrado que AST está elevada en enfermedades que afectan a otros órganos además del hígado, tal como infarto del miocardio, pancreatitis aguda, anemia hemolítica aguda, quemaduras graves, enfermedad renal aguda, enfermedades musculoesqueléticas y traumatismos.

Similarmente a ALT todos los grupos mostraron un aumento en los niveles de AST el día 1 después de cirugía CLP ( $p < 0,001$  frente simulación). Sin embargo, similarmente a la función hepática, ambos grupos de ratones sépticos tratados con NOX-D19 demostraron niveles de AST menos pronunciados en comparación con ratones tratados con vehículo (Figura 17 B).

#### **Ejemplo 9: El ácido nucleico de unión a C5a mejorado, NOX-D20, muestra eficacia en el modelo de ligamiento y punción cecal de múridos para septicemia polimicrobiana.**

El efecto de inyecciones intraperitoneales de NOX-D20 sobre el curso de la septicemia polimicrobiana se analizó en un modelo de ligamiento y punción cecal (CLP) de roedores.

### **Métodos**

#### **Modelo animal**

Se indujo septicemia polimicrobiana en ratones C57BL/6 machos de 10 a 12 semanas (Charles River Laboratories, Alemania) tal como se describe en el Ejemplo 8 con 60 - 75% del ciego ligado.

#### **Supervivencia**

Se mantuvo un seguimiento de 7 días en cada grupo. Los ratones fueron monitorizados diariamente y se generaron curvas de supervivencia de Kaplan Meier utilizando el programa informático GraphPad Prism 4.

### **Grupos de estudio**

Se analizaron 5 grupos ( $n = 5$  ratones para cirugía de simulación y  $n = 10$  ratones por grupo para cirugía CLP): (1) cirugía de simulación con tratamiento con vehículo (solución salina), (2) cirugía CLP con tratamiento con vehículo, (3) cirugía CLP con un tratamiento con NOX-D20 a dosis baja (1 mg/kg) diariamente, (4) cirugía CLP con tratamiento con NOX-D20 a alta dosis (3 mg/kg) diariamente y (5) cirugía CLP con una sola dosis baja de NOX-D20 (1 mg/kg) después de la cirugía seguido por tratamiento diario con vehículo. Los investigadores desconocían la estrategia del tratamiento, y no sabían que compuesto contenía vehículo o el producto del tratamiento. La vía de administración fue i.p.

### **Parámetros inflamatorios y de química clínica**

Se obtuvieron muestras de sangre tal como se describe en el Ejemplo 8 bajo anestesia ligera con éter, a partir del seno cavernoso con un capilar el día 1 después de la cirugía. Se midieron los marcadores habituales en suero de lesión de riñón aguda (creatinina en suero y nitrógeno de urea en sangre, BUN), insuficiencia hepática aguda (ALT en suero) y lesión endotelial (lactato-deshidrogenasa en suero, LDH en suero). Se llevó a cabo un lavado peritoneal (PL) utilizando 3 mL de PBS. El volumen de PL recogido se midió en cada muestra, y se evaluó el recuento total de células utilizando un hemocitómetro (Neubauer Zaehlkammer, Gehrden, Alemania). Los niveles en suero y PL del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina-6 (IL-6), y CCL2 (= proteína quimioatrayente de macrófagos-1, MCP-1) se cuantificaron mediante ensayo de citometría de flujo basado en perlas (CBA Kit, BD Biosciences, Heidelberg, Alemania). Las concentraciones en suero y PL de CXCL1 (= quimioatrayente de queratinocitos, KC) y CXCL2 (= proteína inflamatoria de macrófagos-2, MIP-2) se determinaron por ELISA (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania). El recuento celular diferencial en PL se llevó a cabo en citoespinas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) (cytospin4, Thermo Scientific).

### **Fuga capilar**

Inmediatamente después de la cirugía CLP, se inyectó intravenosamente azul Evans al 0,25% p/v (200  $\mu$ L). Después de 18 horas, los ratones fueron sacrificados y se llevó a cabo PL tal como se describió anteriormente. Las concentraciones del colorante azul Evans en suero y los fluidos de PL se midieron espectrofotométricamente a 620 nm. Se utilizó la siguiente fórmula para corregir las densidades ópticas por contaminación con hemopigmentos: E620 (corregido) = E620 (sin procesar) - (E405 (sin procesar)  $\times$  0,014). Se cuantificó la exudación en plasma como la relación entre extinción en fluido de PL y la extinción en plasma.

### **Estadística**

Se calculó la significación estadística por un ensayo ANOVA de una vía y Dunnett. Para la supervivencia, se llevó a cabo una prueba de rango logarítmico para la significación. Se utilizó el programa informático GraphPad Prism 4.

### **Resultados**

#### **Supervivencia**

Tal como se esperaba, no ocurrió mortalidad en ratones operados de forma simulada a los 7 días después de la cirugía (Figura 18). En ratones CLP tratados con vehículo, la supervivencia mediana fue 3 días. El tratamiento diario de los ratones con 1 mg/kg de NOX-D20, prolongó significativamente la supervivencia mediana hasta 7 días ( $p=0,0043$  frente al vehículo). Un aumento de la dosificación hasta 3 mg/kg de NOX-D20 no tuvo un efecto protector adicional con una supervivencia mediana similar de 6,5 días ( $p=0,0092$  frente al vehículo). Notablemente, una sola inyección de 1 mg/kg de NOX-D20 después de cirugía CLP, fue tan eficaz como el tratamiento diario, y la supervivencia mediana se prolongó significativamente hasta 6,5 días (Figura 18). Aunque el 100% de los ratones tratados con vehículo murieron a los 5 días, 30-40% de los ratones tratados con NOX-D20 aún estaban vivos al final del experimento el día 7 (Figura 18).

#### **Función de órganos**

La inflamación sistémica con frecuencia origina insuficiencia multiorgánica. Los niveles aumentados en suero de creatinina y BUN son parámetros para la tasa de filtración glomerular disminuida e insuficiencia renal. Ambos parámetros estaban significativamente aumentados en ratones tratados con vehículo un día después de la cirugía CLP en comparación con ratones de simulación. El tratamiento con NOX-D20 evitó eficazmente el aumento de ambos marcadores, lo que implica un efecto protector de NOX-D20 sobre la función renal (Figura 19 A, B). La alanina-aminotransferasa (ALT) es un marcador común de lesión y necrosis hepatocelular y la septicemia inducida por CLP estuvo asociada con un aumento en los niveles de ALT en suero. Los ratones tratados con NOX-D20 demostraron niveles significativamente reducidos de ALT en suero en comparación con ratones tratados con vehículo lo que sugiere una función hepática mejorada (Figura 19 C). Los niveles en suero elevados de lactato-deshidrogenasa (LDH) ocurren después de lesión de tejidos y por consiguiente son un marcador general de insuficiencia de órganos. El aumento en niveles de LDH provocado por CLP fue bloqueado eficazmente por NOX-D20 (Figura 20 A). La rotura de la barrera endotelial y la formación de edemas, es un episodio fatal común en septicemia. La inducción de septicemia dio como resultado un aumento del doble en la extravasación relativa de

proteínas plasmáticas en la cavidad peritoneal en ratones tratados con vehículo en comparación con operados de forma simulada. El tratamiento con NOX-D20 inhibió significativamente la fuga capilar (Figura 20 B). Para todos los parámetros aquí analizados, 1 mg/kg de NOX-D20 fue suficiente para mejorar significativamente la función de órganos lo cual se refleja en la supervivencia mejorada de ratones tratados con NOX-D20.

## 5 ***Inflamación***

CLP dio como resultado una sobreregulación fuerte local y sistémica de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. El bloqueo de C5a por NOX-D20 redujo eficazmente las concentraciones de TNF $\alpha$ , IL-6, CCL2, CXCL1 y CXCL2 en el peritoneo y en suero el día 1 después de CLP. La sobreregulación de estas quimioquinas está asociada con un reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en el peritoneo. Por consiguiente, la inhibición de C5a por NOX-D20 inhibió la acumulación de PMN en la cavidad peritoneal (Figura 20 C). En forma similar, se bloqueó la infiltración de monocitos por NOX-D20.

## 10 **Ejemplo 10: Eficacia de NOX-D21 en un modelo de lesión renal aguda inducida por isquemia/reperfusión**

Se analizó el efecto de NOX-D21 sobre la lesión renal aguda (AKI) en un modelo de roedor de lesión renal por isquemia/reperfusión (IRI).

## 15 **Métodos**

### ***Modelo animal***

Se anestesiaron ratones C57BL/6 machos de 12 a 15 semanas (Charles River, Alemania) utilizando isoflurano por medio de una máscara nasal y se colocaron en posición supina en una mesa de calentamiento para mantener la temperatura del cuerpo alrededor de 32°C. Se llevó a cabo una incisión de la línea media y se pinzó el pedículo renal derecho e izquierdo con una pinza de micro-aneurisma durante 30 minutos. Después de la retirada de la pinza y la sutura de la piel, los ratones se devolvieron a las jaulas y se monitorizaron hasta que despertaron completamente.

### ***Grupos de estudio***

Se analizaron 3 grupos ( $n = 10$  ratones por grupo): (1) cirugía IRI con tratamiento con vehículo, (2) cirugía IRI con tratamiento con NOX-D21 a dosis baja (1 mg/kg), (3) cirugía IRI con tratamiento con NOX-D20 a dosis alta (10 mg/kg). Los investigadores desconocían la estrategia del tratamiento y no sabían que compuesto contenía vehículo o el producto del tratamiento. Se administró por vía i.v NOX-D21. 1 hora antes de la cirugía el día 0 y durante los siguientes 3 días (d1-d3) se les administró i.p. una vez al día.

### ***Supervivencia***

30 Los ratones fueron monitorizados diariamente durante 14 días. Se generaron curvas de supervivencia de Kaplan Meier y se determinó la significación mediante ensayo de rango logarítmico utilizando el programa informático GraphPad Prism 4.

### ***Resultados***

35 La supervivencia se mejoró significativamente por el tratamiento con NOX-D21 (Figura 21) a alta dosis. El tratamiento con NOX-D21 a baja dosis dio como resultado una mejora de la supervivencia evidente, aunque todavía no estadísticamente significativa. En el grupo de control tratado únicamente con vehículo, sólo un ratón sobrevivió hasta el día 14. El tratamiento con NOX-D21 aumentó el porcentaje de ratones supervivientes a 45-55% (Figura 21).

### ***Referencias***

- Los datos bibliográficos completos citados en el presente documento, si no se indica lo contrario son los siguientes.
- 40 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 215(3):403-10.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25(17):3389-402.
- Arumugam TV, Shiels IA, Strachan AJ, Abbenante G, Fairlie DP, Taylor SM (2003) A small molecule C5a receptor antagonist protects kidneys from ischemia/reperfusion injury in rats. Kidney Int 63(1): 134-142
- 45 Arumugam TV, Woodruff TM, Stocks SZ, Proctor LM, Pollitt S, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM (2004) Protective effect of a C5a humana receptor antagonist against hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats. J Hepatol 40(6): 934-941
- Bergh K, Iversen OJ, Lysvand H. (1993). Surprisingly high levels of anaphylatoxin C5a des Arg are extractable from psoriatic scales. Arch Dermatol Res 285(3):131-134.

- Biesecker G, Dihel L, Enney K, Bendele RA (1999) Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5. *Immunopharmacology* 42(1-3): 219-230.
- Bonifati DM, Kishore U. (2007) Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol* 44(5): 999-1010.
- 5 Bosmann M, Ward PA (2012) Role of C3, C5 and anaphylatoxin receptors in acute lung injury and in septicemia. *Adv Exp Med Biol* 946: 147-159
- Breivik T, Gundersen Y, Gjermo P, Taylor SM, Woodruff TM, Opstad PK (2011) Oral treatment with complement factor C5a receptor (CD88) antagonists inhibits experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 46(6): 643-647
- 10 Chen M, Daha MR, Kallenberg CG (2010) The complement system in systemic autoimmune disease. *J Autoimmun* 34(3): J276-286
- Copland DA, Hussain K, Baalasubramanian S, Hughes TR, Morgan BP, Xu H, Dick AD, Nicholson LB (2010) Systemic and local anti-C5 therapy reduces the disease severity in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clin Exp Immunol* 159(3): 303-314
- 15 Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA (1999) Protective effects of C5a blockade in septicemia. *Nat Med* 5(7): 788-792
- Damha MJ and Ogilvie KK, Methods in Molecular Biology, Vol. 20 Protocols for oligonucleotides and analogs, ed. S. Agrawal, p. 81-114, Humana Press Inc. (1993)
- Ehrnthal C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M (2011) New Insights of an Old Defense System: Structure, Function, and Clinical Relevance of the Complement System. *Mol Med* 17(3-4): 317-329
- 20 Farkas I, Baranyi L, Liposits ZS, Yamamoto T, Okada H (1998) Complement C5a anaphylatoxin fragment causes apoptosis in TGW neuroblastoma cells. *Neuroscience* 86(3): 903-911
- Fernandez HN, Hugli TE (1978) Primary structural analysis of the polypeptide portion of C5a humana anaphylatoxin. Polypeptide sequence determination and assignment of the oligosaccharide attachment site in C5a. *J Biol Chem* 253(19): 6955-6964
- 25 Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Day DE, Zetoune FS, Sarma JV, Huber-Lang MS, Ward PA (2008) Functions of the complement components C3 and C5 during septicemia. *FASEB J* 22(10): 3483-3490
- Fonseca MI, Ager RR, Chu SH, Yazan O, Sanderson SD, LaFerla FM, Taylor SM, Woodruff TM, Tenner AJ (2009) Treatment with a C5aR antagonist decreases pathology and enhances behavioral performance in murine models of Alzheimer's disease. *J Immunol* 183(2): 1375-1383
- 30 Gueler F, Rong S, Gwinner W, Mengel M, Brocker V, Schon S, Greten TF, Hawlisch H, Polakowski T, Schnatbaum K, Menne J, Haller H, Shushakova N (2008) Complement 5a receptor inhibition improves renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 19(12): 2302-2312
- Heller T, Hennecke M, Baumann U, Gessner JE, zu Vilsendorf AM, Baensch M, Boulay F, Kola A, Klos A, Bautsch W, Kohl J. (1999) Selection of a C5a receptor antagonist from phage libraries attenuating the inflammatory response in immune complex disease and ischemia/reperfusion injury. *J Immunol* 163(2):985-994.
- 35 Hillmen P, Muus P, Duhrsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, Schrezenmeier H, Szer J, Brodsky RA, Hill A, Socie G, Bessler M, Rollins SA, Bell L, Rother RP, Young NS (2007). Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 110(12):4123-8
- Huber-Lang M, Sarma VJ, Lu KT, McGuire SR, Padgaonkar VA, Guo RF, Younkin EM, Kunkel RG, Ding J, Erickson R, Curnutte JT, Ward PA (2001) Role of C5a in multiorgan failure during septicemia. *J Immunol* 166(2): 1193-1199
- 40 Huber-Lang MS, Younkin EM, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, Curnutte JT, Erickson R, Ward PA (2002) Complement-induced impairment of innate immunity during septicemia. *J Immunol* 169(6): 3223-3231
- Jacob A, Hack B, Bai T, Brorson JR, Quigg RJ, Alexander JJ (2010a) Inhibition of C5a receptor alleviates experimental CNS lupus. *J Neuroimmunol* 221(1-2):46-52
- 45 Jacob A, Hack B, Chiang E, Garcia JG, Quigg RJ, Alexander JJ (2010b) C5a alters blood-brain barrier integrity in experimental lupus. *FASEB J* 24(6):1682-8
- Kambas K, Markiewski MM, Pneumatikos IA, Rafail SS, Theodorou V, Konstantonis D, Kourtzelis I, Doumas MN, Magotti P, Deangelis RA, Lambris JD, Ritis KD (2008) C5a and TNF-alpha up-regulate the expression of tissue factor in intra-alveolar neutrophils of patients with the acute respiratory distress syndrome. *J Immunol* 180(11): 7368-7375

- Khan MA, Jiang X, Dhillon G, Beilke J, Holers VM, Atkinson C, Tomlinson S, Nicolls MR (2011) CD4+ T cells and complement independently mediate graft ischemia in the rejection of mouse orthotopic tracheal transplants. *Circ Res* 109(11): 1290-1301
- Kirschfink M. (1997) Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology* 38(1-2):51-62.
- 5 Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Kohl J (2009) The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* 46(14): 2753-2766
- Klussmann S. (2006). "The Aptamer Handbook - Functional Oligonucleotides and their Applications." Edited by S. Klussmann. WILEY-VCH, Weinheim, Germany, ISBN 3-527-31059-2
- Kohl J. (2001) Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol* 38(2-3):175-187.
- 10 Kusser W (2000). *J Biotechnol* 74:27-38
- Laudes IJ, Chu JC, Sikranth S, Huber-Lang M, Guo RF, Riedemann N, Sarma JV, Schmaier AH, Ward PA (2002) Anti-c5a ameliorates coagulation/fibrinolytic protein changes in a rat model of septicemia. *Am J Pathol* 160(5): 1867-1875
- Lewis AG, Kohl G, Ma Q, Devarajan P, Kohl J. (2008) Pharmacological targeting of C5a receptors during organ preservation improves kidney graft survival. *Clin Exp Immunol* 153(1): 117-126.
- 15 Li K, Wang N, Peng Q, Lu B, Ma L, Lambris JD, Sacks S, Zhou W (2012) C5a/C5aR signaling is an important negative regulator of murine natural killer cell homeostasis and effector function. *Immunobiology* 217(11): 1146
- Makrides SC. (1998) Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev* 50(1):59-87.
- Manderson AP, Botto M, Walport MJ. (2004) The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 22: 431-456
- 20 Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, Coukos G, Lambris JD (2008) Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol.* (11):1225-35
- McGinnis S, Madden TL (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W20-5.
- Min X, Wei L, Li Z, Sacks S, Zhou W, Li K (2012) Negative regulation of human natural killer cells by complement. *Immunobiology* 217(11): 1189
- 25 Muller-Ladner U, Jones JL, Wetsel RA, Gay S, Raine CS, Barnum SR. (1996) Enhanced expression of chemotactic receptors in multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci* 144(1-2):135-141.
- Needleman & Wunsch (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol.* 48(3):443-53.
- 30 Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, Chen Y, Zhang K, Ambati BK, Baffi JZ, Ambati J. (2006) Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2328-2333
- Ostrand-Rosenberg S (2008) Cancer and complement. *Nat Biotechnol.* 26(12):1348-9.
- 35 Patel SN, Berghout J, Lovegrove FE, Ayi K, Conroy A, Serghides L, Min-oo G, Gowda DC, Sarma JV, Rittirsch D, Ward PA, Liles WC, Gros P, Kain KC (2008) C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. *J Exp Med* 205(5): 1133-1143
- Pearson & Lipman (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444
- Piccolo MT, Wang Y, Sannomiya P, Piccolo NS, Piccolo MS, Hugli TE, Ward PA, Till GO. (1999) Chemotactic mediator requirements in lung injury following skin burns in rats. *Exp Mol Pathol* 66(3):220-226.
- 40 Ricklin D, Lambris JD. (2007) Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol* 25(11): 1265-1275
- Riley RD, Sato H, Zhao ZQ, Thourani VH, Jordan JE, Fernandez AX, Ma XL, Hite DR, Rigel DF, Pellas TC, Peppard J, Bill KA, Lappe RW, Vinten-Johansen J. (2000) Recombinant human complement C5a receptor antagonist reduces infarct size after surgical revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120(2):350-358.
- 45 Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang M, Mackay CR, Zetoune FS, Gerard NP, Cianflone K, Kohl J, Gerard C, Sarma JV, Ward PA (2008) Functional roles for C5a receptors in septicemia. *Nat Med* 14(5): 551-557
- Sim RB, Laich A. (2000) Serine proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 28(5):545-550.

Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482

Sprong T, Brandtzaeg P, Fung M, Pharo AM, Hoiby EA, Michaelsen TE, Aase A, van der Meer JW, van Deuren M, Mollnes TE (2003) Inhibition of C5a-induced inflammation with preserved C5b-9-mediated bactericidal activity in a human whole blood model of meningococcal septicemia. *Blood* 102(10): 3702-3710

5 Tokodai K, Goto M, Inagaki A, Nakanishi W, Ogawa N, Satoh K, Kawagishi N, Sekiguchi S, Nilsson B, Okada N, Okada H, Satomi S (2010) Attenuation of cross-talk between the complement and coagulation cascades by C5a blockade improves early outcomes after intraportal islet transplantation. *Transplantation* 90(12): 1358-1365

10 van der Pals J, Koul S, Andersson P, Gotberg M, Ubachs JF, Kanski M, Arheden H, Olivecrona GK, Larsson B, Erlinge D (2010) Treatment with the C5a receptor antagonist ADC-1004 reduces myocardial infarction in a porcine ischemia-reperfusion model. *BMC Cardiovasc Disord* 10:45

Venkatesan N, Kim SJ, Kim BH (2003) Novel phosphoramidite building blocks in synthesis and applications toward modified oligonucleotides. *Curr Med Chem* 10(19): 1973-1991

Wagner E, Frank MM (2010) Therapeutic potential of complement modulation. *Nat Rev Drug Discov* 9(1): 43-56

Walport MJ. (2001a) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344(14):1058-1066.

15 Walport MJ. (2001b) Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344(15):1140-1144.

Wang Y. (2006) Complementary therapies for inflammation. *Nat Biotechnol* 24(10): 1224-1226

Ward PA (2010a) The harmful role of c5a on innate immunity in septicemia. *J Innate Immun* 2(5): 439-445

Ward PA (2010b) Role of C5 activation products in septicemia. *ScientificWorldJournal* 10: 2395-2402

20 Wincott F, DiRenzo A, Shaffer C, Grimm S, Tracz D, Workman C, Sweedler D, Gonzalez C, Scaringe S, and Usman N (1995). Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 23:2677-2684.

Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. (2003) A potent C5a humana receptor antagonist protects against disease pathology in a rat model of inflammatory bowel disease. *J Immunol* 171(10):5514-5520.

25 Woodruff TM, Strachan AJ, Dryburgh N, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. (2002) Antiarthritic activity of an orally active C5a receptor antagonist against antigen-induced monarticular arthritis in the rat. *Arthritis Rheum* 46(9):2476-2485.

Yao YM, Redl H, Bahrami S, Schlag G. (1998) The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm Res* 47(5): 201-210.

30 Zheng X, Zhang X, Feng B, Sun H, Suzuki M, Ichim T, Kubo N, Wong A, Min LR, Budohn ME, Garcia B, Jevnikar AM, Min WP (2008) Gene silencing of complement C5a receptor using siRNA for preventing ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 173(4): 973-980.

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido L-nucleico capaz de unirse a C5a humana y C5a de ratón, en donde la molécula de ácido L-nucleico comprende un tramo central de nucleótidos, en donde el tramo central de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de:
  - 5 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGKUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>RGGGHUGUKGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 61], en donde n<sub>1</sub> es U o dU, n<sub>2</sub> es G o dG, n<sub>3</sub> es A o dA, n<sub>4</sub> es U o dU, n<sub>5</sub> es U o dU y G, A, U, C, H, K y R son ribonucleótidos, y dU, dG y dA son 2'-desoxirribonucleótidos.
  - 10 2. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tramo central de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de
    - a) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 62],
    - b) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 63],
    - c) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 64],
    - d) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 65],
    - e) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 66],
    - f) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGAUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 67], y
    - g) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGCUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA 3' [SEQ ID NO: 68], en donde n<sub>1</sub> es U o dU, n<sub>2</sub> es G o dG, n<sub>3</sub> es A o dA, n<sub>4</sub> es U o dU, n<sub>5</sub> es U o dU y G, A, U y C son ribonucleótidos, y dU, dG y dA son 2'-desoxirribonucleótidos.
  - 15 3. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el tramo central de nucleótidos consiste en ribonucleótidos y 2'-desoxirribonucleótidos.
  4. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el tramo central de nucleótidos consiste en ribonucleótidos.
  - 20 5. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la molécula de ácido L-nucleico comprende en dirección 5'->3', un primer tramo terminal de nucleótidos, el segundo tramo central de nucleótidos y un segundo tramo terminal de nucleótidos, en donde
    - el primer tramo terminal de nucleótidos comprende de uno a cinco nucleótidos, y
    - el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende de uno a cinco nucleótidos, preferentemente
    - el primer tramo terminal de nucleótidos comprende de tres a cinco nucleótidos, y
  - 25 6. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub>Z<sub>4</sub>G 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' Z<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>Z<sub>7</sub>Z<sub>8</sub>Z<sub>9</sub> 3',
    - en donde
 

Z<sub>1</sub> es G o está ausente, Z<sub>2</sub> es S o está ausente, Z<sub>3</sub> es S o está ausente, Z<sub>4</sub> es B o está ausente, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V o está ausente, Z<sub>7</sub> es S o está ausente, Z<sub>8</sub> es S o está ausente, Z<sub>9</sub> es C o está ausente, y

G, S, B, C, V son ribonucleótidos, y
  - 30 7. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub>Z<sub>4</sub>G 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' Z<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>Z<sub>7</sub>Z<sub>8</sub>Z<sub>9</sub> 3',
    - en donde
 

Z<sub>1</sub> es G o está ausente, Z<sub>2</sub> es S o está ausente, Z<sub>3</sub> es S o está ausente, Z<sub>4</sub> es B o está ausente, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V o está ausente, Z<sub>7</sub> es S o está ausente, Z<sub>8</sub> es S o está ausente, Z<sub>9</sub> es C o está ausente, y

G, S, B, C, V son ribonucleótidos, y
  - 35 8. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el primer tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub>Z<sub>4</sub>G 3' y el segundo tramo terminal de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos de 5' Z<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>Z<sub>7</sub>Z<sub>8</sub>Z<sub>9</sub> 3',
    - en donde
 

Z<sub>1</sub> es G o está ausente, Z<sub>2</sub> es S o está ausente, Z<sub>3</sub> es S o está ausente, Z<sub>4</sub> es B o está ausente, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V o está ausente, Z<sub>7</sub> es S o está ausente, Z<sub>8</sub> es S o está ausente, Z<sub>9</sub> es C o está ausente, y

G, S, B, C, V son ribonucleótidos, y

- a) Z<sub>1</sub> es G, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S y Z<sub>9</sub> es C, o
- b) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S y Z<sub>9</sub> está ausente, o
- c) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente y Z<sub>9</sub> está ausente, o
- 5 d) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente y Z<sub>9</sub> está ausente, o
- e) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S y Z<sub>9</sub> es C, o
- f) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S y Z<sub>9</sub> es C, o
- g) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S y Z<sub>9</sub> es C, o
- 10 h) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> está ausente, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S y Z<sub>9</sub> es C, o
- i) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S y Z<sub>9</sub> está ausente, o
- j) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S y Z<sub>9</sub> está ausente, o
- 15 k) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> está ausente, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> es S y Z<sub>9</sub> está ausente, o
- l) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente y Z<sub>9</sub> está ausente, o
- m) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> es S, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente y Z<sub>9</sub> está ausente, o
- 20 n) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> está ausente, Z<sub>5</sub> es C, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente y Z<sub>9</sub> está ausente, o
- o) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> está ausente, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> es S, Z<sub>8</sub> está ausente y Z<sub>9</sub> está ausente, o
- 25 p) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> es V, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente y Z<sub>9</sub> está ausente, o
- q) Z<sub>1</sub> está ausente, Z<sub>2</sub> está ausente, Z<sub>3</sub> es S, Z<sub>4</sub> es B, Z<sub>5</sub> es C o dC, Z<sub>6</sub> está ausente, Z<sub>7</sub> está ausente, Z<sub>8</sub> está ausente y Z<sub>9</sub> está ausente.
7. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y 4 a 6, en donde la molécula de ácido- nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 90, o una molécula de ácido L-nucleico que tiene una identidad de al menos 85% con la molécula de ácido L-nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 90, o una molécula de ácido L-nucleico que es homóloga a la molécula de ácido L-nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 90, en donde la homología es al menos 85%.
- 30 8. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5 a 6, en donde la molécula de ácido L-nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92, o una molécula de ácido L-nucleico que tiene una identidad de al menos 85% con la molécula de ácido L-nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92, o una molécula de ácido L-nucleico que es homóloga a la molécula de ácido L-nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92, en donde la homología es al menos 85%.
- 40 9. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el ácido nucleico es un antagonista de una actividad mediada por C5a humana y/o de ratón.
- 45 10. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la molécula de ácido L-nucleico comprende un grupo de modificación, en donde la tasa de excreción de la molécula de

ácido L-nucleico que comprende el grupo de modificación de un organismo, está disminuida en comparación con la de un ácido L-nucleico que no comprende el grupo de modificación.

5 11. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la molécula de ácido L-nucleico comprende un grupo de modificación, en donde la molécula de ácido L-nucleico que comprende el grupo de modificación tiene un mayor tiempo de permanencia en un organismo en comparación con el de una molécula de ácido L-nucleico que no comprende el grupo de modificación.

10 12. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, en donde el grupo de modificación se selecciona del grupo que comprende modificaciones biodegradables y no biodegradables, preferentemente el grupo de modificación se selecciona del grupo que comprende polietilenglicol, polietilenglicol lineal, polietilenglicol ramificado, hidroxietil-almidón, un péptido, una proteína, un polisacárido, un esterol, polioxipropileno, poloxiamidato y poli(2-hidroxietil)-L-glutamina.

15 13. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en un método para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.

14. La molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la enfermedad está asociada la activación del complemento y los mecanismos patógenos mediados por C5a, y/o se selecciona del grupo que comprende enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, enfermedad de los ojos, lesiones por isquemia/reperfusión, función de injerto retardada, rechazo de trasplantes, enfermedad cardiovascular, enfermedad respiratoria, reacciones agudas, enfermedad infecciosa, enfermedad neurológica, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad fibrótica, enfermedad hematológica, enfermedad metabólica, tumores y complicaciones clínicas asociadas a la activación del complemento por biomateriales, preferentemente el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica se selecciona del grupo que comprende septicemia y daños secundarios de traumatismos o quemaduras graves.

25 15. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de L-ácido nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y opcionalmente un constituyente adicional, en donde el constituyente adicional se selecciona del grupo que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable, un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente farmacéuticamente activo.

20 16. Uso de una molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la fabricación de un medicamento.

30 17. Uso de una molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la fabricación de un medio de diagnóstico.

35 18. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el medicamento es para el tratamiento y/o la prevención de enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, enfermedad de los ojos, lesiones por isquemia/reperfusión, función de injerto retardada, rechazo de trasplantes, enfermedad cardiovascular, enfermedad respiratoria, reacciones agudas, enfermedad infecciosa, enfermedad neurológica, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad fibrótica, enfermedad hematológica, enfermedad metabólica, tumores y complicaciones clínicas asociadas con la activación del complemento por biomateriales, preferentemente el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica se selecciona del grupo que comprende septicemia y daños secundarios de traumatismos o quemaduras graves.

40 19. Un complejo que comprende una molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y C5a, en donde preferentemente el complejo es un complejo cristalino.

20. Uso de una molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la detección de C5a.

21. Un método para el cribado de un antagonista de una actividad mediada por C5a, que comprende las etapas siguientes:

45 - proporcionar un antagonista candidato de la actividad mediada por C5a,  
 - proporcionar una molécula de ácido L-nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12,  
 - proporcionar un sistema de ensayo que proporciona una señal en presencia de un antagonista de la actividad mediada por C5a, y  
 50 - determinar si el antagonista candidato de la actividad mediada por C5a es un antagonista de la actividad mediada por C5a.

22. Un kit para la detección de C5a, en donde el kit comprende una molécula de ácido L-nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y al menos un folleto de instrucciones o un recipiente de reacción.

23. Un método para la detección de un ácido L-nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en una muestra, en donde el método comprende las etapas de:

- 5           a) proporcionar una sonda de captura, en donde la sonda de captura es al menos parcialmente complementaria de una primera parte de la molécula de ácido L-nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y una sonda de detección, en donde la sonda de detección es al menos parcialmente complementaria de una segunda parte de la molécula de ácido L-nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o alternativamente la sonda de captura es al menos parcialmente complementaria de una segunda parte de la molécula de ácido L-nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y la sonda de detección es al menos parcialmente complementaria de una primera parte de la molécula de ácido L-nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12;
- 10           b) añadir la sonda de captura y la sonda de detección, por separado o combinadas, a una muestra que contiene la molécula de ácido L-nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o que se supone que contiene la molécula de ácido L-nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12;
- 15           c) permitir que la sonda de captura y la sonda de detección reaccionen simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden con la molécula de ácido L-nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una de sus partes;
- 20           d) detectar opcionalmente si la sonda de captura se hibrida o no con la molécula de ácido L-nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, proporcionada en la etapa a); y
- e) detectar el complejo formado en la etapa c) que consiste en la molécula de ácido L-nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y la sonda de captura y la sonda de detección.

Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia 5' -3'	KD [nM]
			mC5a huC5a
274-B5-002	001	GCCUGAUGUGGUUGAAGGGUUGGGGUUCGACGCCAAGGC	3.5 12.1
274-D5-002	002	GCCUGAUGUGGUUGAAGGGUUGGGGUUCGACGCCAAGGC	2.2 7.8
274-C8-002	003	GCCUGAUGUGGUUGAAGGGUUGGGGUUCGACGCCAAGGC	0.9 5.1
274-C8-002-G14 (=NOX-D19001)	004	GCCUGAUGUGGUUGAAGGGUUGGGGUUCGACGCCAAGGC	0.3 1.4
274-C5-002	005	GCCUGAUGUGGUUGAAGGGUUGGGGUUCGACGCCAAGGC	0.3 1.6
274-G6-002	006	GCCUGAUGUGGUUGAAGGGGAUGGGGUUCGACGCCAAGGC	1.0 4.8
274-H6-002	007	GCCUGAUGUGGUUGAAGGGCUUGGGGUUCGACGCCAAGGC	n.d. n.d.

Cualquiera de G, C, U y A es un ribonucleótido. Los nucleótidos bordeados por   representan un motivo de unión a C5a.

**KD:** Constante de disociación  $K_D$  de espiégélmberos (ácido L-nucleico), las moléculas de la secuencia indicada se ensayaron como espiégélmberos (ácido L-nucleico) medidos por resonancia de plasmón superficial en Biacore usando unión directa a C5a humana (huC5a) o C5a de ratón (mC5a) inmovilizada covalentemente.

## FIG. 1

Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia: 5' -3'	KD [nM] huC5a
NOX-D19001	004	gcc <u>ucG</u> AUGUGGGUGUAAGGGUUGGUUGGGACGCC <u>CAGGC</u>	1.38
NOX-D19001-D09	008	gcc <u>ucG</u> AUGdUGGGUGUAAGGGUUGGUUGGGACGCC <u>CAGGC</u>	0.71
NOX-D19001-D16	009	gcc <u>ucG</u> AUGUGGGUGdGAAGGGUUGGUUGGGACGCC <u>CAGGC</u>	1.03
NOX-D19001-D17	010	gcc <u>ucG</u> AUGUGGGUGGdAAGGGUUGGUUGGGACGCC <u>CAGGC</u>	0.91
NOX-D19001-D30	011	gcc <u>ucG</u> AUGUGGGUGUAAGGGUUGGUUGGGdUGUCGCC <u>CAGGC</u>	0.77
NOX-D19001-D32	012	gcc <u>ucG</u> AUGUGGGUGUAAGGGUUGGUUGGGdUGUCGCC <u>CAGGC</u>	0.92
NOX-D19001-D40	013	gcc <u>ucG</u> AUGUGGGUGUAAGGGUUGGUUGGGACGCC <u>dCAGGC</u>	0.88

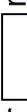
Cualquiera de G,C,U y A es un ribonucleótido; cualquiera de dG, dC, dU y dA es un 2'-desoxirribonucleótido  
 Los nucleótidos bordeados por  representan un motivo de unión a C5a;

**KD:** Constante de disociación  $K_D$  de espiégélmberos (ácido L-nucleico), las moléculas de la secuencia indicada se ensayaron como espiégélmberos (ácido L-nucleico) medidos por resonancia de plasmón superficial por Biacore usando unión directa a C5a humana (hC5a) inmovilizada covalentemente.

## FIG. 2

Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia : 5' -3'	KD [nM]
<b>2 sustituciones de RNA por DNA</b>			
NOX-D19001-D09-30	014	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUGUUUGGdUGUCGACGCC <b>dAGGC</b>	0 . 461
NOX-D19001-D09-32	015	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUGUUUGGUdUGACGCC <b>dAGGC</b>	0 . 566
NOX-D19001-D09-40	016	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUGUUUGGUdUGACGCC <b>dAGGC</b>	0 . 570
NOX-D19001-D30-32	017	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGGUGAAGGGUUGGUdUGACGCC <b>dAGGC</b>	0 . 855
NOX-D19001-D30-40	018	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGGUGAAGGGUUGGUdUGACGCC <b>dAGGC</b>	0 . 624
NOX-D19001-D32-40	019	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGGUGAAGGGUUGGUdUGACGCC <b>dAGGC</b>	0 . 652
<b>3 sustituciones de RNA por DNA</b>			
NOX-D19001-D09-30-32	020	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUGGUdUGACGCC <b>dAGGC</b>	0 . 526
NOX-D19001-D09-30-40	021	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUGGUdUGACGCC <b>dAGGC</b>	0 . 400
NOX-D19001-D09-32-40	022	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUGGUdUGACGCC <b>dAGGC</b>	0 . 448
NOX-D19001-D30-32-40	023	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUGGUdUGACGCC <b>dAGGC</b>	0 . 880
<b>4 sustituciones de RNA por DNA</b>			
NOX-D19001-D09-30-32-40	024	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUGGUdUGACGCC <b>dAGGC</b>	0 . 385
<b>5 sustituciones de RNA por DNA</b>			
NOX-D19001-D09-16-30-32-40	025	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGdGAAGGGUUGGUdUGACGCC <b>dCAGGC</b>	0 . 351
NOX-D19001-D09-17-30-32-40	026	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGdAAAGGGUUGGUdUGACGCC <b>dCAGGC</b>	0 . 308
<b>6 sustituciones de RNA por DNA</b>			
NOX-D19001-D09-16-17-30-32-40 (= NOX-D19001-6xDNA)	027	<b>GCCUG</b> AUGdUGGGUGdGAAGGGUUGGUdUGACGCC <b>dCAGGC</b>	0 . 36

**FIG. 3**

Cualquiera de G, C, U y A es un ribonucleótido; cualquiera de dG, dC, dU y dA es un 2'-desoxirribonucleótido  
Los nucleótidos bordeados por  representan un motivo de unión a C5a

**KD:** Constante de dissociación  $K_D$  de espiegélmeros (ácido L-nucléico), las moléculas de la secuencia indicada se ensayaron como espiegelmberos (ácido L-nucléico) medidos por resonancia de plasmón superficial en Biacore usando unión directa a C5a humana (hC5a) inmovilizada covalentemente .

**FIG. 3 continuación**

Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia: 5' - 3'	KD [nM] huC5a
		nt	nt
NOX-D19001-6xDNA	027	<b>ccccg</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCAGGC</b>	4.4
NOX-D19001-6xDNA -007	028	<b>ccucg</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCAGGC</b>	4.4
NOX-D19001-6xDNA -008	029	<b>cug</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCAGGC</b>	4.3
NOX-D19001-6xDNA -009	030	<b>uga</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCAGGC</b>	4.2
NOX-D19001-6xDNA -010	031	<b>ga</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCAGGC</b>	4.1
NOX-D19001-6xDNA -011	032	<b>ccug</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCAGGC</b>	4.0
NOX-D19001-6xDNA -012	033	<b>ugc</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCAC</b>	4.2
NOX-D19001-6xDNA -013	034	<b>ug</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCA</b>	4.0
NOX-D19001-6xDNA -018	035	<b>gccg</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCGGC</b>	4.2
NOX-D19001-6xDNA -019	036	<b>ggcg</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCGCC</b>	4.2
NOX-D19001-6xDNA -020 (=NOX-D200001)	037	<b>gcg</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCGC</b>	4.0
NOX-D19001-6xDNA -021	038	<b>cug</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCAGC</b>	4.1
NOX-D19001-6xDNA -022	039	<b>ug</b> AUGdUGGGUdGdAAGGGUUGGUUGGGdUGdUCGACCCA <b>dCAGC</b>	4.0

Cualquiera de G,C,U y A es un ribonucleótido; cualquiera de dG, dC, dU y dA es un 2'-desoxirribonucleótido  
 Los nucleótidos bordeados por   representan un motivo de unión a C5a;   nt: número de nucleótidos

**KD:** Constante de disociación  $K_D$  de espiegelmberos (ácido L-nucleíco), las moléculas de la secuencia indicada se ensayaron como espiegelmers (ácido L-nucleíco) medidos por resonancia de plasmón superficial en Biacore usando unión directa a C5a humana (huC5a) inmovilizada covalentemente

**FIG. 4A**

Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia: 5' - 3'	KD [nM]
		nt	huC5a
<b>NOX-D19001-6x DNA</b>	027	<b>cccuG AUGdUGGGGUdGdAAGGGUUGUUGGGauGdUCAGGCCA</b> <b>dCAGGC</b>	44 0 .42
NOX-D19001-6xDNA-023	040	<b>cGAUGdUGGGGUdGdAAGGGUUGUUGGGauGdUCAGGCCA</b> <b>dCAGC</b>	40 9 .38
NOX-D19001-6xDNA-024	041	<b>GAUGdUGGGGUdGdAAGGGUUGUUGGGauGdUCAGGCCA</b> <b>dCAGC</b>	39 8 .29
NOX-D19001-6xDNA-025	042	<b>ccuGAUGdUGGGGUdGdAAGGGUUGUUGGGauGdUCAGGCCA</b> <b>dCAC</b>	41 5 .01
NOX-D19001-6xDNA-026	043	<b>ccuGAUGdUGGGGUdGdAAGGGUUGUUGGGauGdUCAGGCCA</b> <b>dCC</b>	40 16 .8
NOX-D19001-6xDNA-027	044	<b>ccuGAUGdUGGGGUdGdAAGGGUUGUUGGGauGdUCAGGCCA</b> <b>dCA</b>	40 4 .71
NOX-D19001-6x DNA-028	045	<b>cGAUGdUGGGGUdGdAAGGGUUGUUGGGauGdUCAGGCCA</b> <b>dCG</b>	39 3 .36
NOX-D19001-6x DNA-029	046	<b>GAUGdUGGGGUdGdAAGGGUUGUUGGGauGdUCAGGCCA</b> <b>dCC</b>	38 6 .89
NOX-D19001-6xDNA-030	047	<b>ccGAUGdUGGGGUdGdAAGGGUUGUUGGGauGdUCAGGCCA</b> <b>dCC</b>	39 16 .1
NOX-D19001-6x DNA-032	048	<b>ccGAUGdUGGGGUdGdAAGGGUUGUUGGGauGdUCAGGCCA</b> <b>dC</b>	38 5 .58
NOX-D19001-6xDNA-033	049	<b>ccGAUGdUGGGGUdGdAAGGGUUGUUGGGauGdUCAGGCCA</b> <b>dCC</b>	38 5 .47

Cualquiera de G, C, U y A es un ribonucleótido; cualquiera de dG, dC, dU y dA es un 2'-desoxirribonucleótido

Los nucleótidos bordeados por   representan un motivo de unión a C5a; nt: número de nucleótidos

**KD:** Constante de disociación  $K_D$  de espiegélmeros (ácido L-nucleico), las moléculas de la secuencia indicada se ensayaron como espiegélmeros (ácido L-nucleico) medidos por resonancia de plasmón superficial en Biacore usando unión directa a C5a (huC5a) inmovilizada covalentemente.

**FIG. 4B**

Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia : 5' -3'	KD [nM]	IC <sub>50</sub> [nM]
NOX-D19001-020	55	<b>gcg</b> AUGGGGGAAAGGGUUUUGGGUGUCGACGCC <b>ccg</b>	11.3	9.4
<b>1 Sustitución de RNA por DNA</b>				
NOX-D19001-1x DNA-020	56	<b>ccg</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUUUGGGUGUCGACGCC <b>ccg</b>	1.34	3
<b>2 Sustituciones de RNA por DNA</b>				
NOX-D19001-2x DNA-020	57	<b>ccg</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUUUGGGdUGUCGACGCC <b>ccg</b>	0.73	2.2
<b>3 Sustituciones de RNA por DNA</b>				
NOX-D19001-3x DNA-020	58	<b>ccg</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUUUGGGdUGdUCGACGCC <b>ccg</b>	0.91	3.7
NOX-D19001-2dU-1dC-020 (=NOX-D21001)	59	<b>ccg</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUUUGGGdUGUCGACGCC <b>dcgc</b>	0.82	0.6
<b>4 Sustituciones de RNA por DNA</b>				
NOX-D19001-3dU-1dC-020	60	<b>ccg</b> AUGdUGGGUGAAGGGUUUUGGGdUGdUCGACGCC <b>ddcc</b>	0.87	0.6

Cualquiera de G, C, U y A es un ribonucleótido; cualquiera de dG, dC, dU y dA es un 2'-desoxirribonucleótido

Los nucleótidos bordeados por  representan un motivo de unión a C5a;

**KD:** Constante de dissociación K<sub>D</sub> de espiégélmberos (ácido L-nucleico), las moléculas de la secuencia indicada se ensayaron como espiégelmers (ácido L-nucleico) medidos por resonancia de plasmón superficial en Biacore usando unión directa a C5a humana (hC5a) immobilizada covalentemente.

**IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibidora del 50% de espiégélmberos (ácido L-nucleico), las moléculas de la secuencia indicada se ensayaron como espiégelmers en un cultivo celular en un ensayo de quimiotaxis *in vitro* para inhibir C5a.

**FIG. 5**

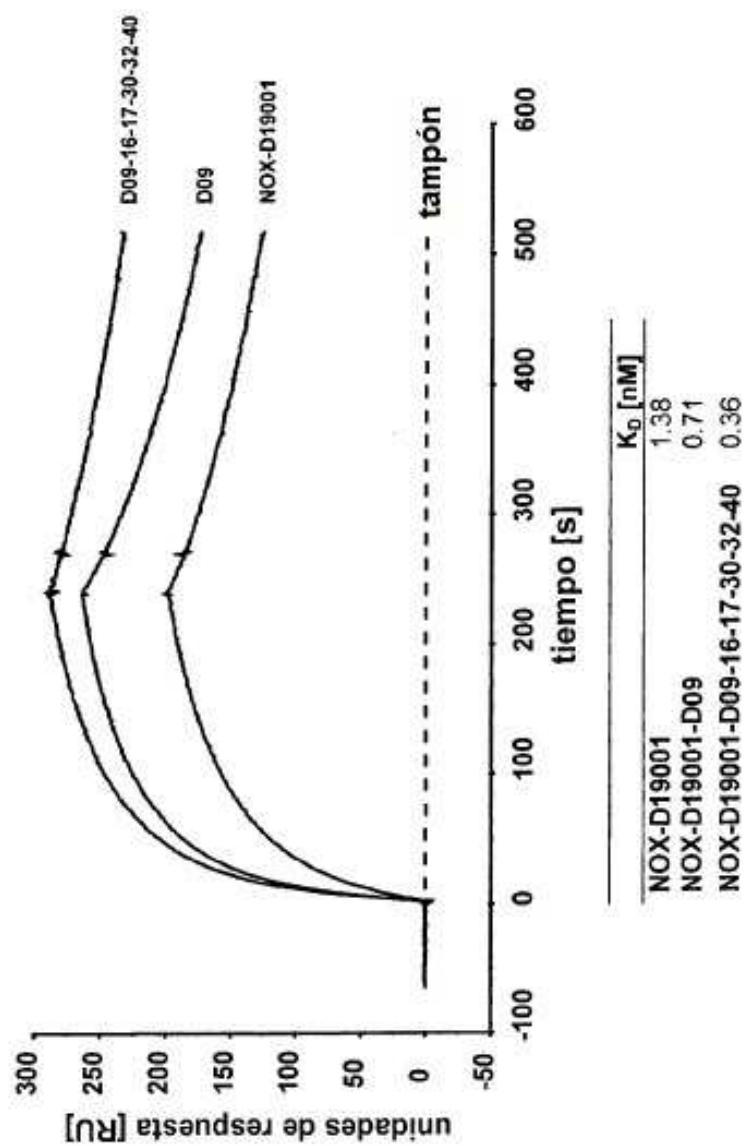


FIG. 6

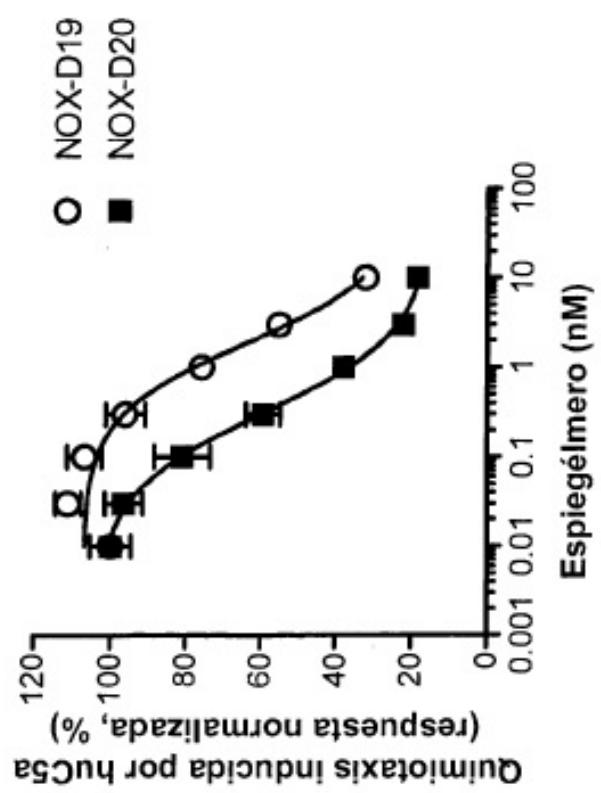
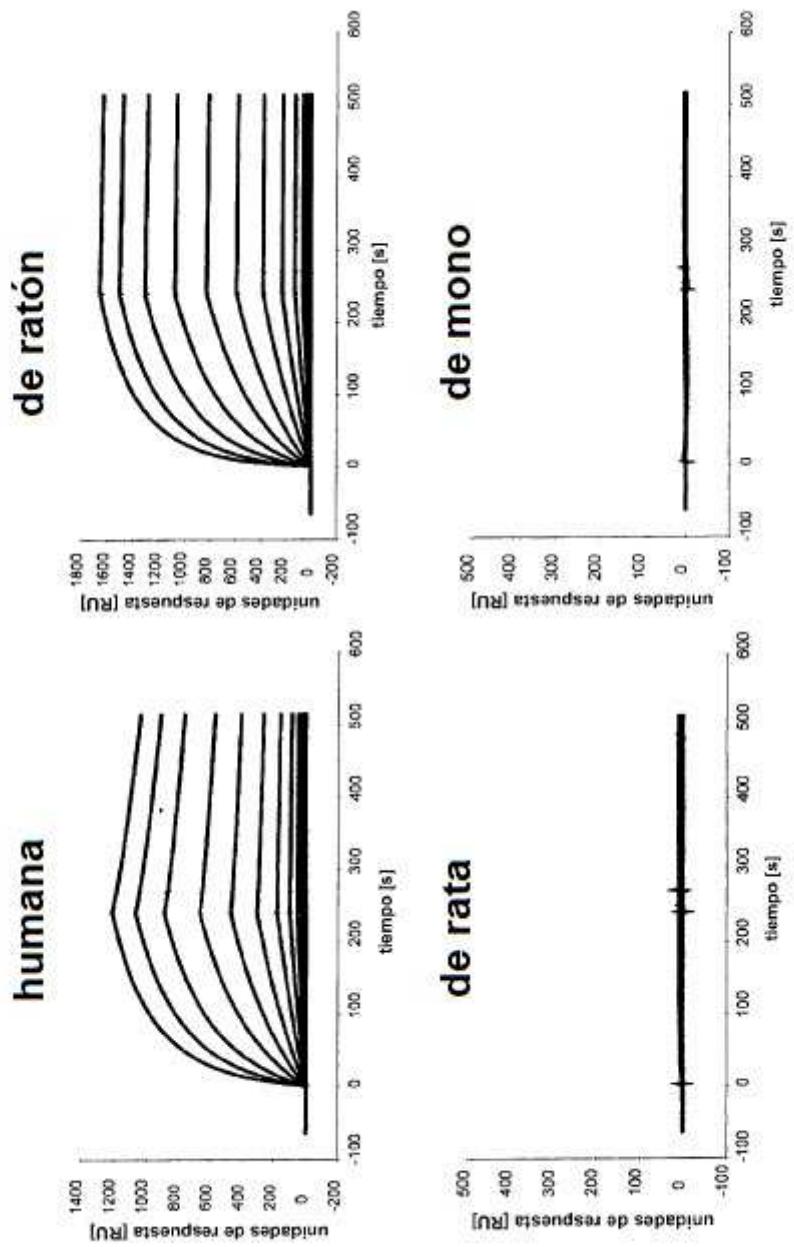


FIG. 7

**FIG. 8**

NOX-D20 unión a:	K <sub>d</sub> [pM]
C5a de ratón	19,1
C5a humana	299
C5a de rata	—
C5a de mono rhesus	—

**FIG. 8** continuación

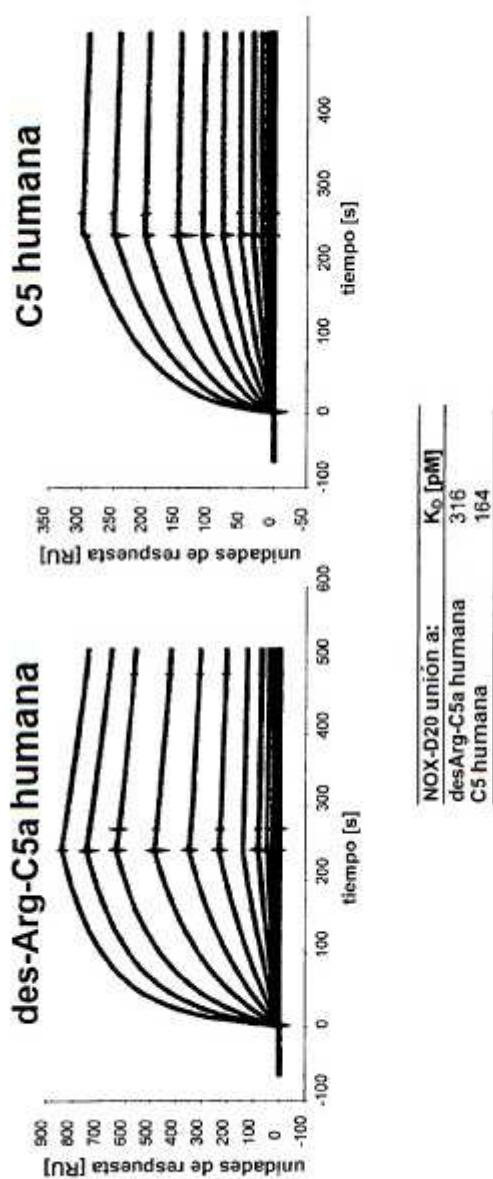
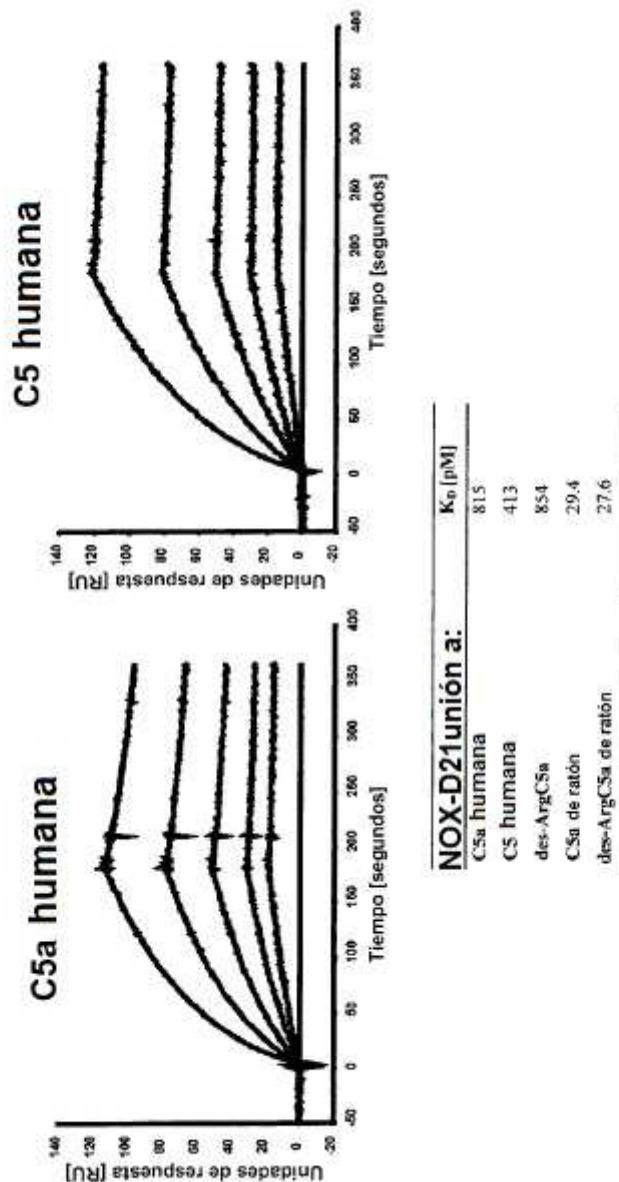


FIG. 9



NOX-D21 unión a:	K <sub>d</sub> [pM]
C5a humana	81.5
C5 humana	41.3
des-ArgC5a	85.4
C5a de ratón	29.4
desArgC5a de ratón	27.6

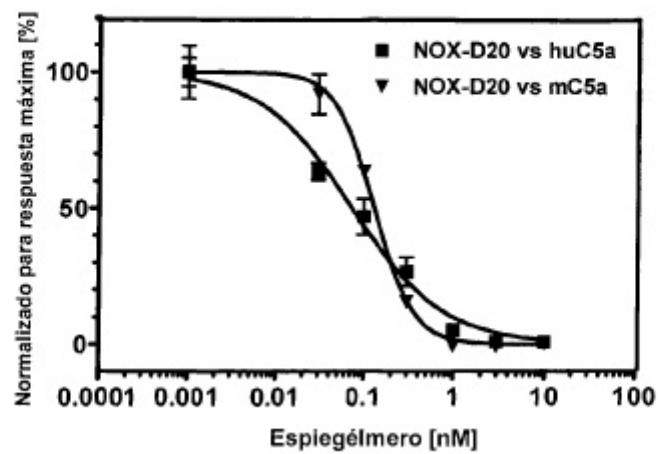
**FIG. 10**

**Alineación de C5a de especies seleccionadas**

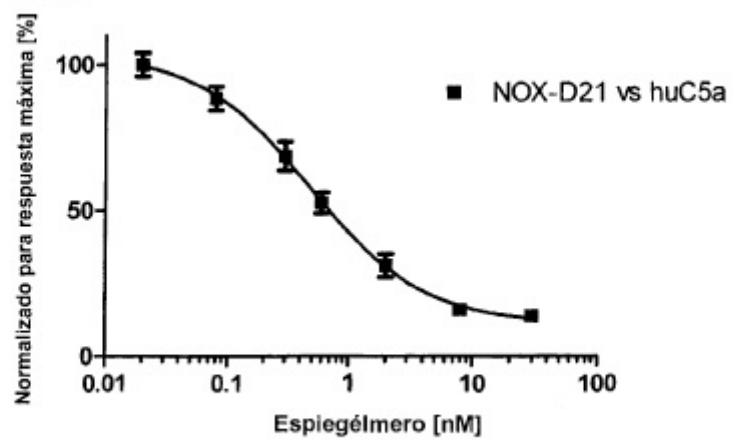
<b>humana :</b> [SEQ ID NO: 050]	TLQQKIEETAAKYKHSVVKCCYDGACVNNDTCEQRAARISLGPRCIKAFFTECCVVASQLRANISHKDMQLGR
<b>de Rhesus :</b> [SEQ ID NO: 054]	MLQEKEETAAKYKHLVVKCCYDGVRINHDETCEQRAARISVGPRCVMKAFFTECCVVASQLRANNISHKDLQIAGR
<b>de ratón :</b> [SEQ ID NO: 052]	NLHLLRKTEEQAQAKYKHSVVKCCYDGARVNFYETCEERVARTIGPUCIRAFNECCTIANKIRKESPHKPVQLGR
<b>de rata :</b> [SEQ ID NO: 051]	DLQLLHQKVEEQAQAKYKHRVPKKCCYDGARENKYETCEQRVARVTIGPHCIRAFNECCTIADKIRKESHHKGMLLGR

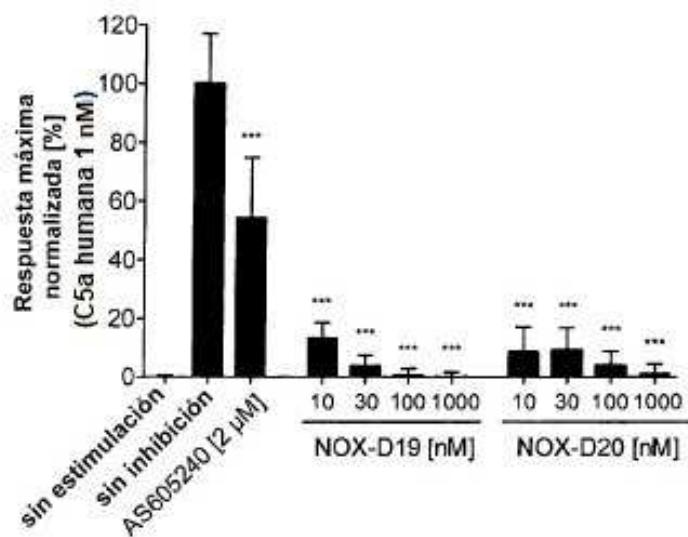
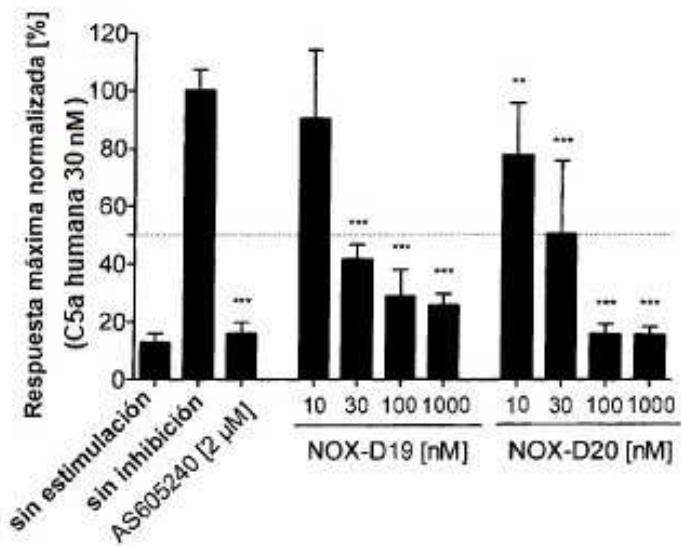
**FIG. 11**

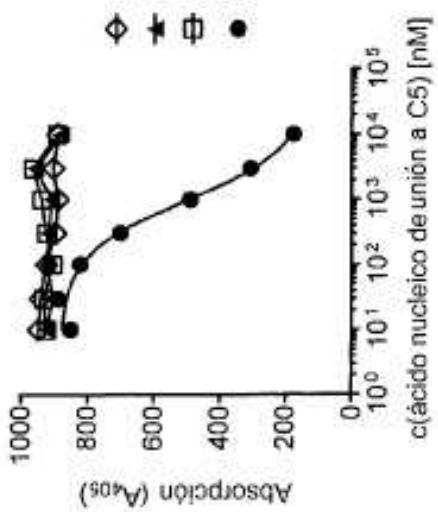
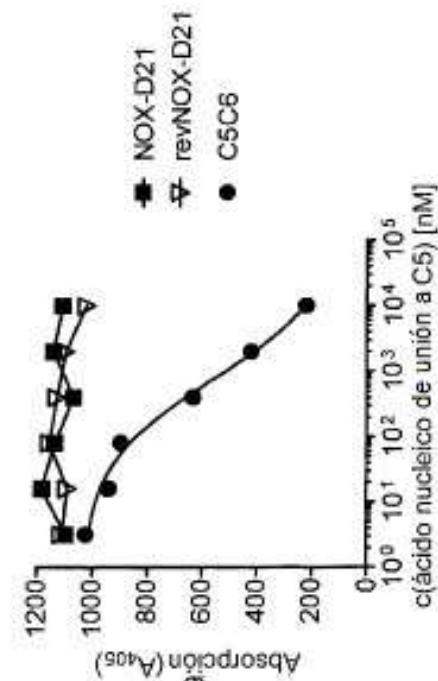
**FIG. 12A**



**FIG. 12B**



**FIG. 13A****FIG. 13B**

**FIG. 14A****FIG. 14B**

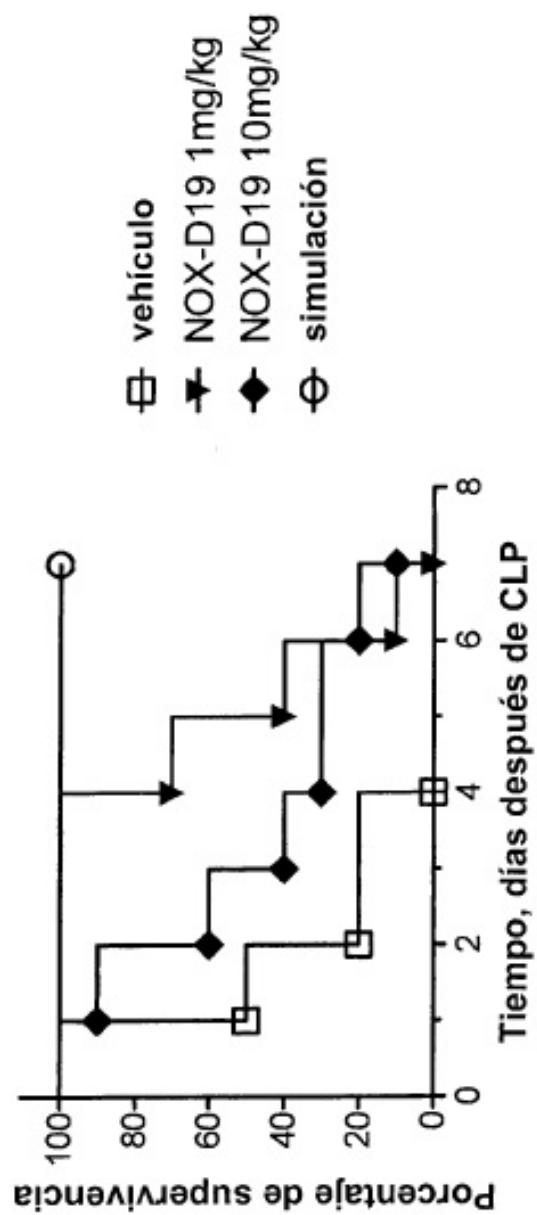


FIG. 15

FIG. 16A

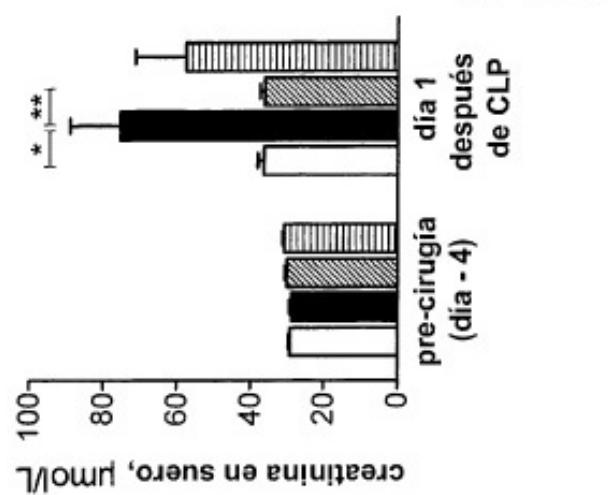
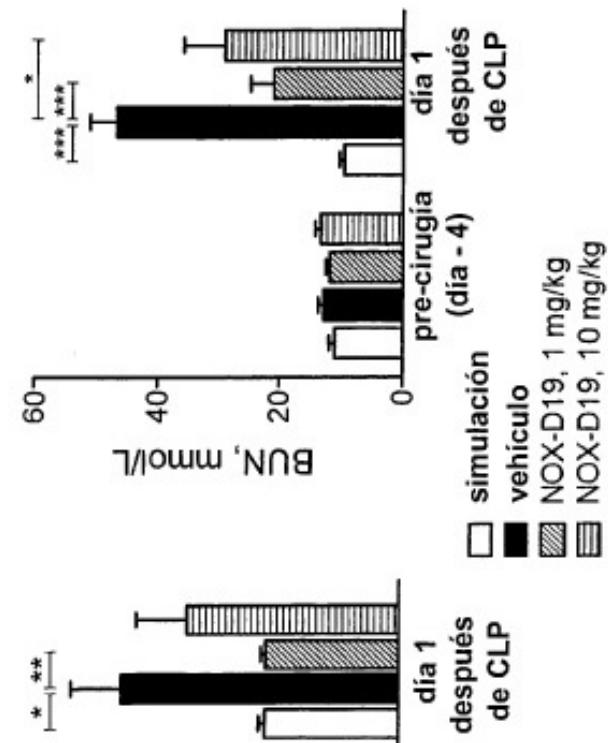
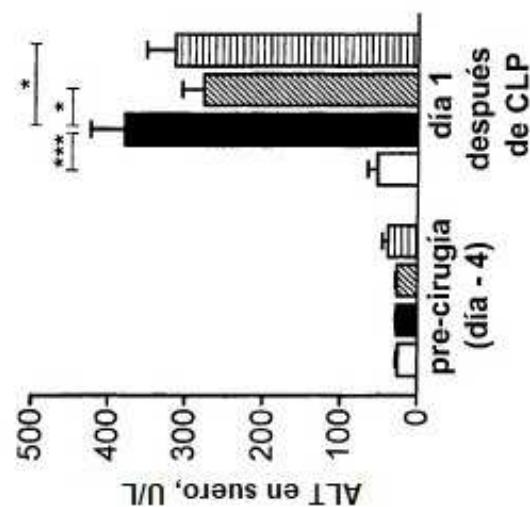
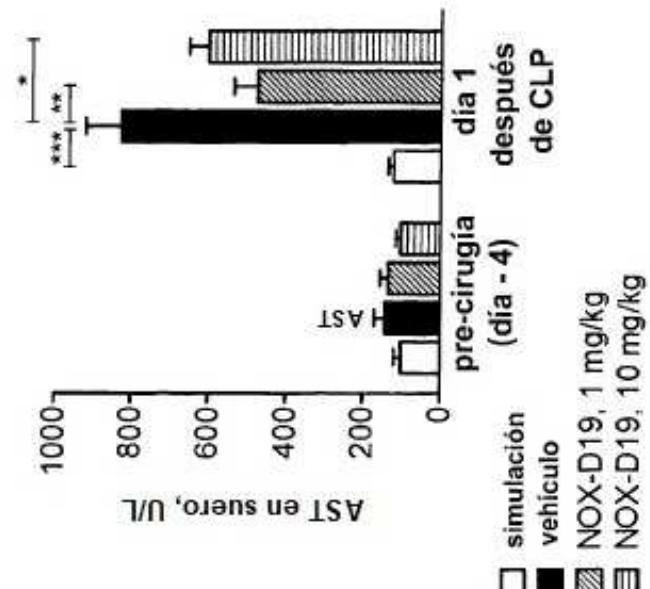


FIG. 16B



**FIG. 17A****FIG. 17B**

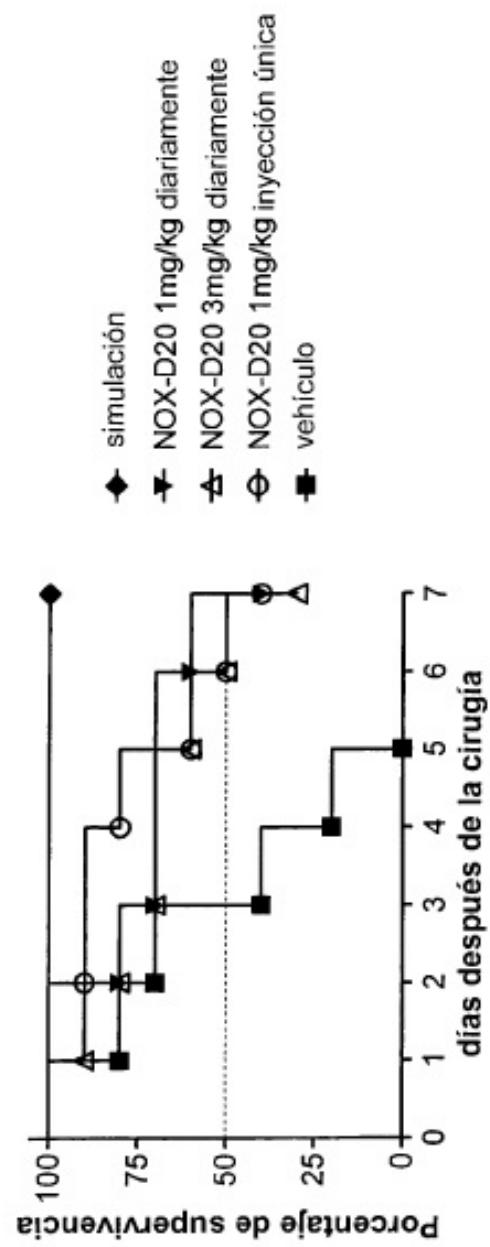
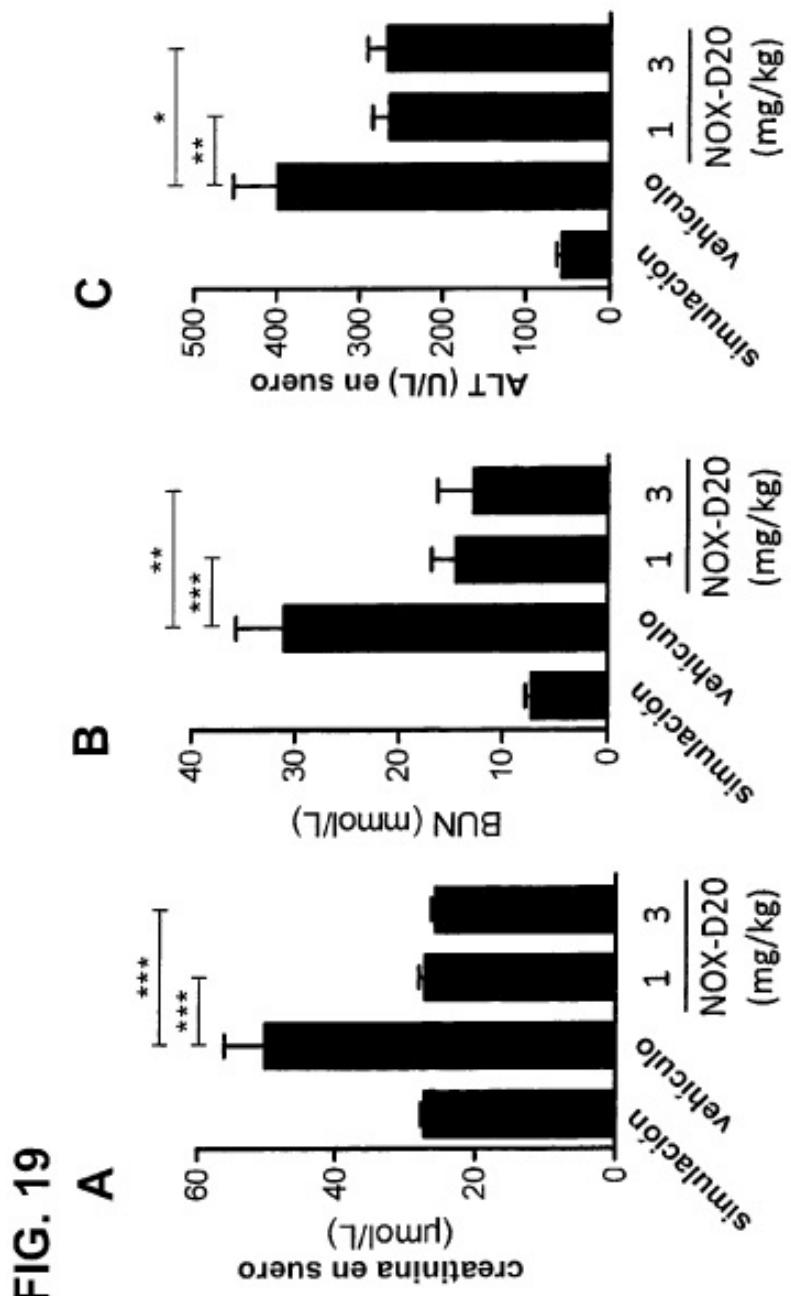
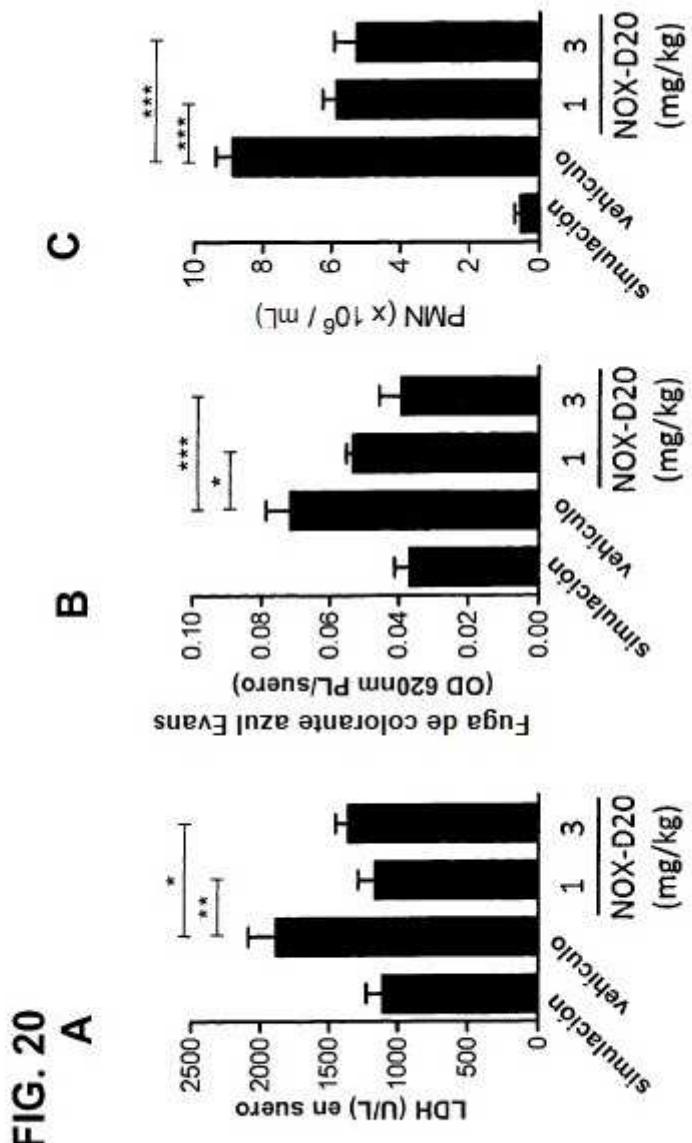


FIG. 18





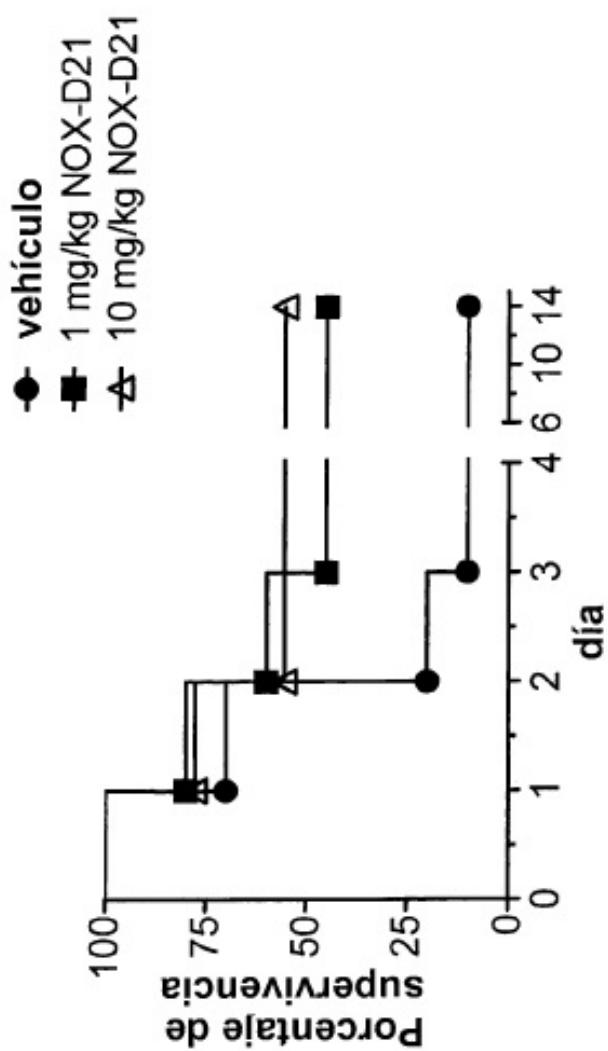
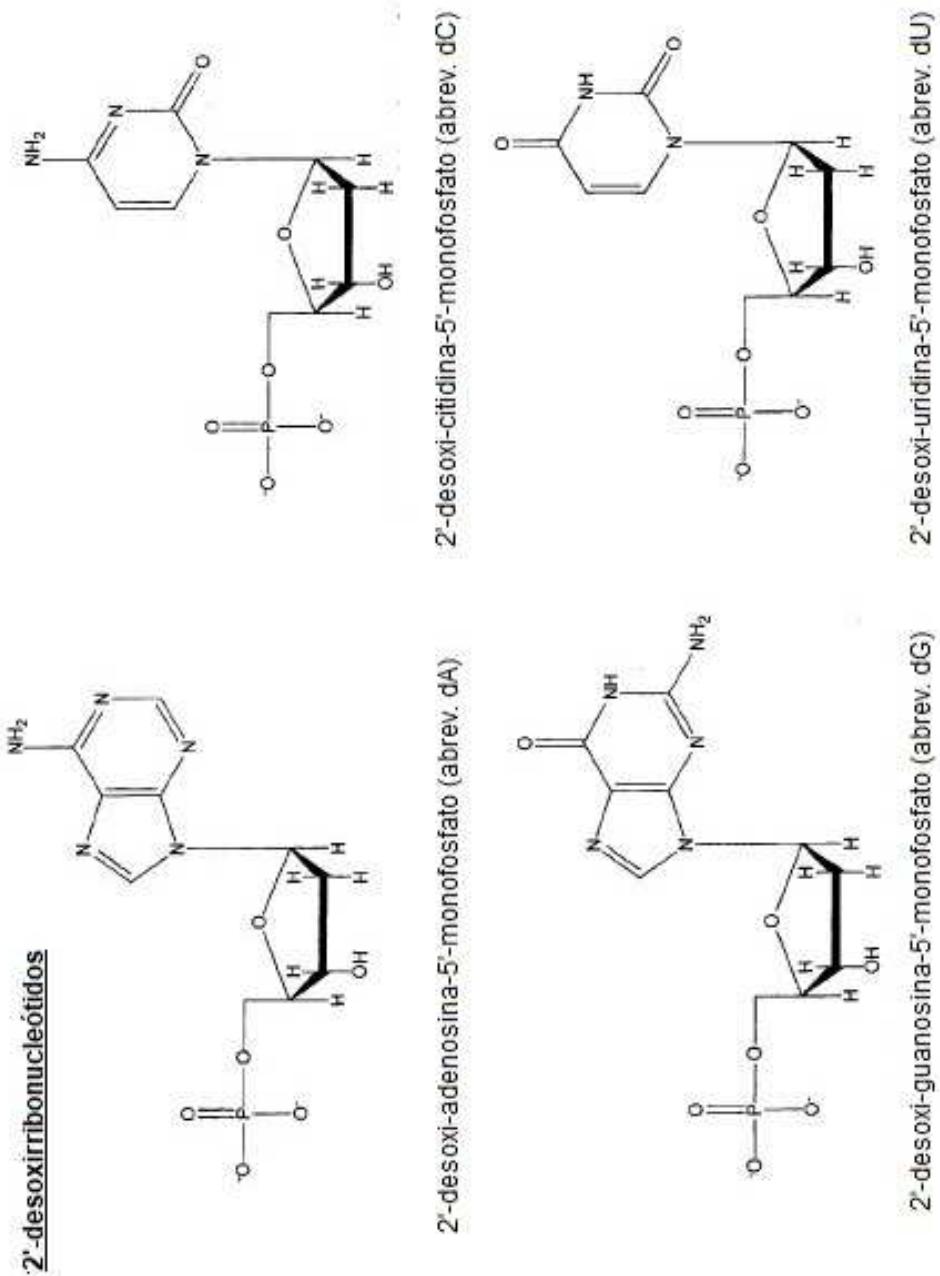
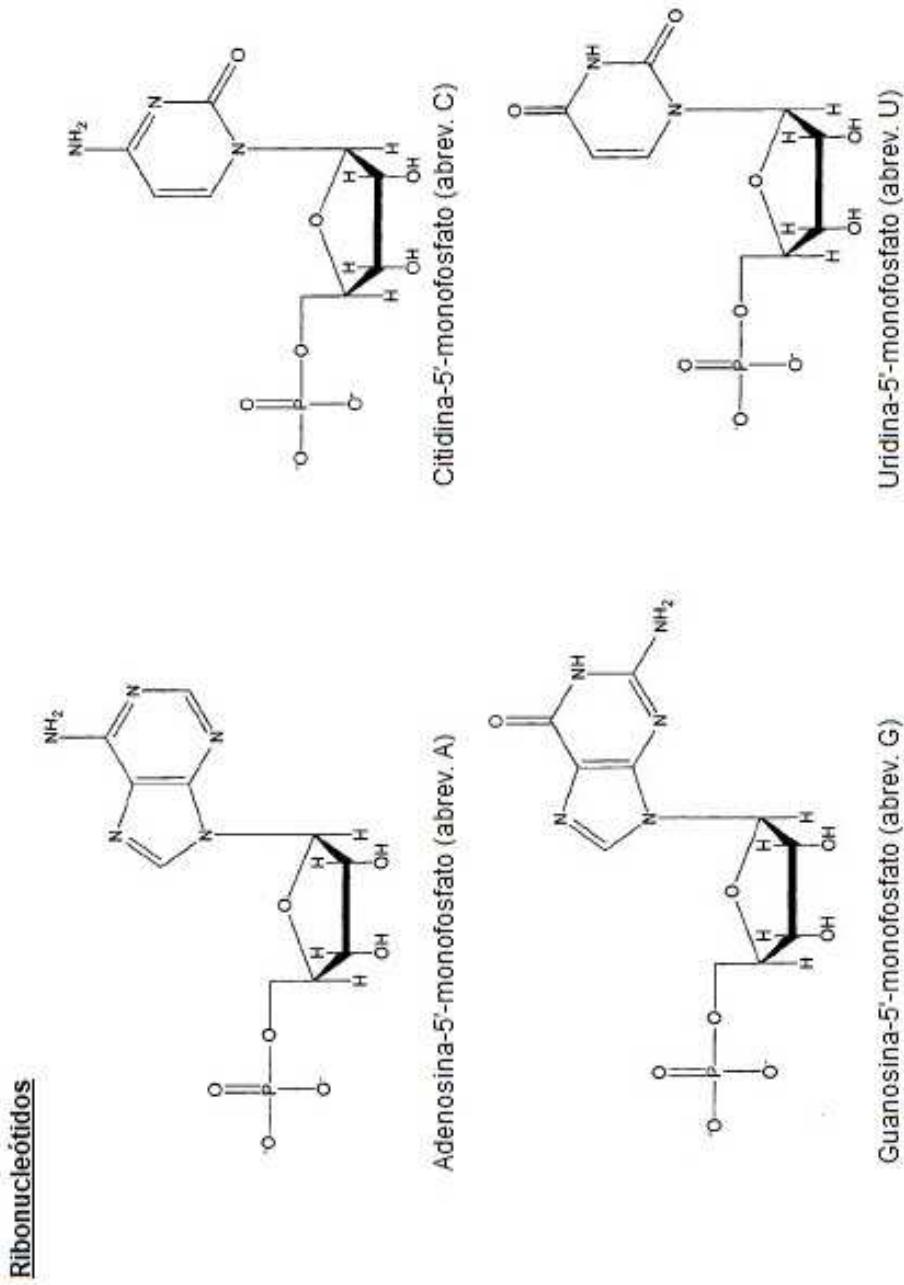


FIG. 21

**FIG. 22**

**FIG. 23**