



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 351 784**

51 Int. Cl.:  
**C07H 21/04** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02739409 .7**  
96 Fecha de presentación : **28.05.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1401853**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2004**

54 Título: **Moduladores de agentes farmacológicos.**

30 Prioridad: **25.05.2001 US 293231 P**  
**07.11.2001 US 331037 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.02.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.02.2011**

73 Titular/es: **Duke University**  
**Office of Licensing and Ventures**  
**2812 Erwin Road, Suite 306**  
**Durham, North Carolina 27705, US**

72 Inventor/es: **Sullenger, Bruce, A. y**  
**Rusconi, Christopher**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 351 784 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

Moduladores de agentes farmacológicos.

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/293.231, presentada el 25 de mayo de 2001, y la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/331.037, presentada el 7 de noviembre de 2001.

**Campo técnico**

10 La presente invención se refiere, en general, a un modulador oligonucleotídico que revierte la actividad farmacológica de un aptámero contra factores de coagulación.

**Antecedentes**

15 Convencionalmente se ha pensado que los ácidos nucleicos desempeñan principalmente una tarea informativa en procesos biológicos. A través de un método conocido como Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial, llamado SELEX, ha quedado claro que los ácidos nucleicos tienen diversidad estructural tridimensional no diferente a las proteínas. SELEX es un método para la síntesis *in vitro* y la selección de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica a moléculas diana. El proceso SELEX se describió por primera vez por Gold y Tuerk en la solicitud de patente de Estados Unidos Nº Ser. 07/536.428, presentada el 11 de junio de 1990, ahora Patente de Estados Unidos Nº 5.475.096, y después en la solicitud de patente de Estados Unidos Nº Ser. 07/931.473, presentada el 17 de agosto de 1992, titulada "Methods for Identifying Nucleic Acid Ligands (Métodos para identificar ligandos de ácido nucleico)", ahora Patente de Estados Unidos Nº 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813). Véase también Tuerk *et al.*, Science 249: 505-10 (1990).

25 Los ligandos de ácido nucleico o aptámeros son ácidos nucleicos (ADN o ARN) monocatenarios no codificantes que tienen la propiedad de unirse específicamente a un compuesto o molécula diana deseado, y que tienen suficiente capacidad para formar una diversidad de estructuras bi y tridimensionales y suficiente versatilidad química disponible dentro de sus monómeros para actuar como ligandos (formar pares de unión específicos) con casi cualquier compuesto químico, sea monomérico o polimérico. Moléculas de cualquier tamaño o composición pueden servir como dianas. El método SELEX implica la selección entre una mezcla de oligonucleótidos candidatos e iteraciones por etapas de unión, separación y amplificación, usando el mismo esquema de selección general, para conseguir casi cualquier criterio deseado de afinidad y selectividad de unión. Partiendo de una mezcla de ácidos nucleicos, preferiblemente compuesta por segmentos de secuencias aleatorizadas, el método SELEX incluye las etapas de poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión, separar los ácidos nucleicos no unidos de aquellos ácidos nucleicos que se han unido específicamente a moléculas diana, disociar los complejos ácido nucleico-diana, amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos ácido nucleico-diana para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando, después reiterar las etapas de unión, separación, disociación y amplificación a través de todos los ciclos que se deseen para producir ligandos de ácido nucleico de elevada afinidad altamente específicos para la molécula diana.

30 Los ligandos de ácido nucleico tienen varias características que pueden volverlos útiles como agentes terapéuticos. Pueden prepararse como compuestos sintéticos relativamente pequeños (por ejemplo, de 8 kDa a 15 kDa) y pueden seleccionarse para que tengan elevada afinidad y especificidad por moléculas diana (constantes de disociación en equilibrio que varían de, por ejemplo, 0,05-10 nM). Los aptámeros abarcan tanto las propiedades de afinidad de los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos de cadena sencilla (scFv) como la facilidad de fabricación similar a la de un péptido pequeño. Estudios iniciales demostraron el uso *in vitro* de los aptámeros para estudiar la función proteica, y estudios más recientes han confirmado la utilidad de estos compuestos para estudiar la función proteica *in vivo* (Floege *et al.*, Am J Pathol 154: 169-179 (1999), Ostendorf *et al.*, J Clin Invest 104: 913-923, (1999)). Además, estudios en animales hasta la fecha han mostrado que los aptámeros y compuestos de composición similar se toleran bien, muestran baja o ninguna inmunogenicidad, y son por tanto adecuados para la administración repetida como compuestos terapéuticos (Floege *et al.*, Am J Pathol 154: 169-179 (1999), Ostendorf *et al.*, J Clin Invest 104: 913-923 (1999), Griffin *et al.*, Blood 81: 3271-3276 (1993), Hicke *et al.*, J Clin Invest 106: 923-928 (2000)).

35 Como compuestos sintéticos, pueden hacerse modificaciones específicas de sitio (inserciones o deleciones) a los aptámeros para alterar de forma racional su biodisponibilidad y modo de eliminación. Por ejemplo, se ha descubierto que aptámeros modificados con 2'-fluoro pirimidina en el intervalo de tamaño de 10 kDa a 12 kDa tienen una vida media en circulación corta (~10 minutos) después de administración intravenosa en embolada pero que una simple modificación química del aptámero o la conjugación del aptámero con una molécula vehículo de elevado peso molecular (por ejemplo, PEG) aumenta la vida media en circulación sustancialmente (6-12 horas) (Willis *et al.*, Bioconjug Chem 9: 573-582 (1998), Tucker *et al.*, J Chromatogr Biomed Sci Appl 732: 203-212 (1999), Watson *et al.*, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 10: 63-75 (2000)). Se han descrito ligandos de ácido nucleico monocatenarios bioactivos y resistentes a nucleasa que comprenden L-nucleótidos (Williams *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 11285 (1997); documento USP 5.780.221; Leva *et al.*, Chem. Biol. 9: 351 (2002)). Estos "L-aptámeros" son, según se informa, estables en condiciones en las que los aptámeros que comprenden nucleótidos de quiralidad natural (D-nucleótidos) (es decir, "D-aptámeros") están sometidos a degradación.

Varias terceras personas han solicitado y conseguido patentes que cubren la identificación, fabricación y uso de aptámeros. Como se ha indicado anteriormente a Larry Gold y Craig Tuerk se les atribuye generalmente el primer desarrollo del método SELEX para aislar aptámeros, y su método se describe en varias patentes de Estados Unidos incluyendo aquellas mencionadas anteriormente y las Patentes de Estados Unidos N° 5.670.637, 5.696.249, 5.843.653, 6.110.900, y 5.270.163, así como otras descritas en la Descripción Detallada de la Invención. Thomas Bruice *et al.* informaron de un proceso para producir aptámeros en la Patente de Estados Unidos N° 5.686.242, que difiere del proceso SELEX original presentado por Tuerk y Gold porque emplea oligonucleótidos estrictamente aleatorios durante la secuencia de exploración. Los oligonucleótidos explorados en el proceso de la patente '242 carecen de los cebadores oligonucleotídicos que están presentes en oligonucleótidos explorados en el proceso SELEX.

Varias patentes de Gold *et al.* se refieren a los propios aptámeros. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.114.120 se refiere a un aptámero que se une a una macromolécula celular. La Patente de Estados Unidos N° 5.670.637 se refiere a aptámeros que se unen a proteínas. La Patente de Estados Unidos N° 5.696.249 se refiere a un aptámero producido por el proceso SELEX.

Se han expedido otras patentes que se refieren a aptámeros contra dianas biológicas específicas, y a los métodos para identificar estos aptámeros. Las Patente de Estados Unidos N° 5.756.291 y 5.582.981 de O'Toole, por ejemplo, describen un método para detectar trombina usando un aptámero marcado que comprende una secuencia de seis nucleótidos definida. Las Patentes de Estados Unidos N° 5.527.894 y 5.637.461 de Gold *et al.* se refieren a métodos para identificar aptámeros contra la proteína tat. Otras patentes que describen aptámeros dirigidos contra dianas biológicas específicas incluyen las Patentes de Estados Unidos N° 5.496.938 (transcriptasa inversa de VIH), 5.476.766 (trombina), 5.459.015 (factor de crecimiento de fibroblastos), 5.472.841 (elastasa de neutrófilos), 5.849.479 (factor de crecimiento del endotelio vascular), 5.726.017 (GAG de VIH), 5.731.144 (TGF $\beta$ ), 5.827.456 (hormona gonadotropina coriónica), 5.780.228 (lectinas), 5.766.853 (selectinas), 5.674.685 (factor de crecimiento derivado de plaquetas), 5.763.173 (ADN polimerasas), 6.140.490 (proteínas del sistema del complemento), y 5.869.641 (CD4).

Sullenger, Rusconi, Kontos y White en el documento WO 0226932 A2 describen aptámeros de ARN que se unen a factores de coagulación, factores de transcripción de la familia E2F, Ang1, Ang2, y fragmentos o péptidos de los mismos, factores de transcripción, anticuerpos autoinmunes y receptores de superficie celular útiles en la modulación de la hemostasis y otros acontecimientos biológicos. (Véase también Rusconi *et al.*, Thrombosis and Haemostasis 83: 841-848 (2000), White *et al.*, J. Clin Invest 106: 929-34 (2000), Ishizaki *et al.*, Nat Med 2: 1386-1389 (1996), y Lee *et al.*, Nat Biotechnol 15: 41-45 (1997)).

También se han expedido varias patentes que se refieren a usos específicos de aptámeros. Por ejemplo, Bruice *et al.* en la Patente de Estados Unidos N° 6.022.691 describen el uso de aptámeros identificados por un proceso tipo SELEX para detectar fármacos y otras moléculas en fluidos biológicos. Gold *et al.* en la Patente de Estados Unidos N° 5.843.653 proporcionan un método de diagnóstico usando aptámeros. La Patente de Estados Unidos N° 6.110.900 describe una composición de diagnóstico que contiene un aptámero. La Patente de Estados Unidos N° 5.789.163 describe un ensayo tipo sándwich que emplea aptámeros como ligando de captura y/o detección. La Patente de Estados Unidos N° 6.147.204 describe el uso de aptámeros/complejos lipófilos para suministrar aptámeros terapéuticos y de diagnóstico a localizaciones intracelulares *in vivo*. Las Patentes de Estados Unidos N° 5.705.337, 5.962.219, 5.763.595 y 5.998.142 describen aptámeros que están modificados químicamente para unirse covalentemente a proteínas diana.

Se han desarrollado varios métodos que modifican el proceso SELEX básico para obtener aptámeros que satisfagan objetivos además de mostrar elevada afinidad de unión hacia una molécula diana. Por ejemplo, varias patentes describen el uso de nucleótidos modificados en el proceso SELEX para obtener aptámeros que muestren propiedades mejoradas. La Patente de Estados Unidos N° 5.660.985, por ejemplo, se refiere a SELEX usando nucleótidos 2'-modificados que presentan estabilidad potenciada *in vivo*. La Patente de Estados Unidos N° 6.083.696 describe un proceso SELEX "combinado" en el que se exploran oligonucleótidos unidos covalentemente a unidades funcionales no de ácido nucleico para su capacidad de unirse a una molécula diana. Otras patentes describen modificaciones post-SELEX a los aptámeros para disminuir su tamaño, aumentar su estabilidad, o aumentar la afinidad de unión a la diana. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.817.785 y 5.648.214.

Otras patentes más describen procesos SELEX únicos. Por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.763.566 y 6.114.120 describen procesos para generar aptámeros usando el proceso SELEX con tejido biológico completo como diana, para identificar aptámeros que tengan afinidad de unión hacia tejidos biológicos y componentes del mismo. La Patente de Estados Unidos N° 5.580.737 describe una modificación al proceso SELEX que produce aptámeros que pueden discriminar entre dos o más compuestos. La Patente de Estados Unidos N° 5.567.588 describe el método "SELEX en solución" en el que la mezcla de ácidos nucleicos candidatos se explora en solución para amplificar de forma preferente el aptámero de mayor afinidad.

Kauffman ha obtenido patentes que describen la generación de grandes bibliotecas de proteínas a partir de grandes combinaciones de vectores oligonucleotídicos generados de forma estocástica. Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.814.476 y 5.723.323.

Weis *et al.* describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.245.022 un oligonucleótido de aproximadamente 12-25 bases que está sustituido en el extremo por un polialquilenglicol. Se ha informado de que estos oligonucleótidos modificados son resistentes a la actividad exonucleasa.

Las Patentes de Estados Unidos N° 5.670.633 y 6.005.087 de Cook *et al.* describen 2'-fluoro oligonucleótidos térmicamente estables que son complementarios a una secuencia básica de ARN o ADN. Las Patentes de Estados Unidos N° 6.222.025 y 5.760.202 de Cook *et al.* describen la síntesis de pirimidinas 2'-O sustituidas y oligómeros que contienen las pirimidinas modificadas. El documento EP 0 593 901 B1 describe análogos de oligonucleótido y ribozima con enlaces 3',3'- y 5',5'-nucleosídicos terminales. La Patente de Estados Unidos N° 6.011.020 de Gold *et al.* describe un aptámero modificado por polietilenglicol.

Se han expedido varias patentes de Estados Unidos que describen métodos de fabricación a gran escala que pueden usarse para producir aptámeros. Caruthers *et al.*, por ejemplo, describen en las Patentes de Estados Unidos N° 4.973.679; 4.668.777; y 4.415.732 una clase de compuestos de fosforamidita que son útiles en la fabricación de oligonucleótidos. En otra serie de patentes, Caruthers *et al.* describen un método para sintetizar oligonucleótidos usando un soporte polimérico inorgánico. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.500.707, 4.458.066 y 5.153.319. En otra serie de patentes más, Caruthers *et al.* describen una clase de fosforoditioatos nucleosídicos que pueden usarse para fabricar oligonucleótidos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.278.302, 5.453.496 y 5.602.244. Informes de aptámeros diseñados para unirse a otros aptámeros incluyen: Aldaz-Carroll L, Tallet B, Dausse E, Yurchenko L, Toulme JX; Apical loop-internal loop interactions: a new RNA-RNA recognition motif identified through *in vitro* selection against RNA hairpins of the hepatitis C virus mRNA; *Biochemistry*. 7 de mayo de 2002; 41(18): 5883-93; Darfeuille F, Cazenave C, Gryaznov S, Duconge F, Di Primo C, Toulme JJ.; RNA and N3'→P5' kissing aptamers targeted to the trans-activation responsive (TAR) RNA of the human immunodeficiency virus-1, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. Abril-julio de 2001; 20(4-7): 441-9; Collin D, van Heijenoort C, Boiziau C, Toulme JJ, Guittet E., NMR characterization of a kissing complex formed between the TAR RNA element of HIV-1 and a DNA aptamer. *Nucleic Acids Res*. 1 de septiembre de 2000; 28(17): 3386-91; Duconge F, Di Primo C, Toulme JJ., Is a closing "GA pair" a rule for stable loop-loop RNA complexes? *J Biol Chem*. 14 de julio de 2000; 275(28): 21287-94; Duconge F, Toulme JJ. *In vitro* selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1, *RNA*. Diciembre de 1999; 5(12): 1605-14; Boiziau C, Dausse E, Yurchenko L, Toulme JJ., DNA aptamers selected against the HIV-1 trans-activation-responsive RNA element form RNA-DNA kissing complexes; *J Biol Chem*. 30 de abril de 1999; 274(18): 12730-7; y Le Tinevez R, Mishra RK, Toulme JJ., Selective inhibition of cell-free translation by oligonucleotides targeted to a mRNA hairpin structure; *Nucleic Acids Res*. 15 de mayo de 1998; 26(10): 2273-8.

Actualmente, muchos fármacos provocan complicaciones médicas tales como efectos secundarios y consecuencias indeseables o incontrolables. Tratar las complicaciones médicas provocadas por los efectos secundarios conduce a costes sanitarios adicionales. La reciente identificación de esta gama de ligandos de ácido nucleico útiles en terapia médica ha abierto nuevas vías de investigación y desarrollo. Aunque se han hecho progresos en esta área, sigue existiendo una fuerte necesidad de proporcionar métodos y composiciones para mejorar el modo en que se usan estos ligandos y para aumentar su eficacia, de controlar mejor el proceso de terapia, y de proporcionar terapias que tengan efectos secundarios disminuidos sobre los métodos terapéuticos tradicionales. La presente invención proporciona moduladores oligonucleotídicos para mejorar el proceso para usar un aptámero contra factores de coagulación en terapia médica. El enfoque proporcionado por la presente invención permite más control sobre el efecto terapéutico, la farmacocinética y la duración de la actividad de un aptámero contra factores de coagulación.

### Sumario de la invención

Se ha descubierto que los efectos anticoagulantes y antitrombóticos de aptámeros contra factores de coagulación que están dirigidos a componentes de la vía de coagulación de la sangre pueden revertirse de forma específica y rápida *in vivo* para producir un efecto biológico deseado. Estos aptámeros son ácidos nucleicos monocatenarios que se unen a un factor de coagulación. Esto puede conseguirse a través de la administración de un modulador oligonucleotídico, que hibride en condiciones fisiológicas con dicho aptámero, que cambie la unión del aptámero contra factores de coagulación con su diana o que degrade o escinda de otro modo, metabolice o descomponga el aptámero contra factores de coagulación mientras el aptámero contra factores de coagulación aún está ejerciendo su efecto. Los moduladores de la presente invención pueden administrarse a tiempo real según sea necesario en base a diversos factores, incluyendo el progreso del paciente, así como el criterio del médico sobre cómo conseguir una terapia óptima. Por tanto, esta invención proporciona por primera vez un régimen terapéutico regulable en el transcurso de la terapia con aptámero contra factores de coagulación.

A partir de ahora referencias a un "ligando de ácido nucleico" o "ligando" significarán un "aptámero contra factores de coagulación" que es un ácido nucleico monocatenario que se une a un factor de coagulación. A partir de ahora referencias a un "modulador" significarán un "modulador oligonucleotídico que hibrida en condiciones fisiológicas con un aptámero contra factores de coagulación".

Este régimen terapéutico regulable controla la acción del fármaco introduciendo un modulador que es fácil de usar, puede ser independiente del estado de salud del paciente, tiene un modo uniforme de acción, y no requiere infusión continua del fármaco. En un ejemplo, se proporciona un antídoto que está diseñado de forma racional para desactivar la actividad del aptámero cuando lo desee el médico.

El modulador es un oligonucleótido, o un producto unido de cualquiera de estos. Por ejemplo, el modulador puede ser un oligonucleótido que es complementario a al menos una parte del ligando de ácido nucleico. En otra realización, el modulador puede ser una ribozima o ADNzima que está dirigido al ligando de ácido nucleico. En una realización

adicional, el modulador puede ser un ácido péptido nucleico (PNA), un ácido morfolino nucleico (MNA), un ácido nucleico cerrado (LNA) u oligonucleobases pseudocíclicas (PCO) que incluyen una secuencia que es complementaria a o híbrida con al menos una parte del ligando de ácido nucleico. Un ligando de ácido nucleico típico tiene algo de estructura secundaria - su estructura terciaria activa depende de la formación de la estructura secundaria estable apropiada. Por lo tanto, aunque el mecanismo de formación de un dúplex entre un modulador oligonucleotídico complementario de la invención y un ligando de ácido nucleico es el mismo que entre dos oligorribonucleótidos lineales cortos, las normas para diseñar dichas interacciones y la cinética de formación de dicho producto están afectadas por la estructura intramolecular del aptámero. La velocidad de nucleación es importante para la formación del dúplex estable final, y la velocidad de esta etapa se potencia enormemente dirigiendo el modulador oligonucleotídico a bucles monocatenarios y/o tramos finales 3' ó 5' monocatenarios presentes en el ligando de ácido nucleico. Para que suceda la formación del dúplex intermolecular, la energía libre de formación del dúplex intermolecular tiene que ser favorable con respecto a la formación de los dúplex intramoleculares existentes dentro del ligando de ácido nucleico marcado como diana.

En una realización alternativa de la invención, el propio modulador es un aptámero. En esta realización, primero se genera un ligando de ácido nucleico que se une al agente terapéutico deseado. En una segunda etapa, se genera un segundo ligando de ácido nucleico que se une al primer ligando de ácido nucleico usando el proceso SELEX descrito en este documento u otro proceso, y modula la interacción entre el ligando de ácido nucleico terapéutico y la diana. En una realización, el segundo ligando de ácido nucleico desactiva el efecto del primer ligando de ácido nucleico. "Modular" o "regular" en el contexto de este documento significa "revertir de forma específica y rápida".

En otras realizaciones alternativas, el aptámero que se une a la diana puede ser un PNA, MNA, LNA o PCO y el modulador es un ligando de ácido nucleico. Como alternativa, el aptámero que se une a la diana es un PNA, MNA, LNA o PCO, y el modulador es un PNA. Como alternativa, el aptámero que se une a la diana es un PNA, MNA, LNA o PCO, y el modulador es un MNA. Como alternativa, el aptámero que se une a la diana es un PNA, MNA, LNA o PCO, y el modulador es un LNA. Como alternativa, el aptámero que se une a la diana es un PNA, MNA, LNA o PCO, y el modulador es PCO. Cualquiera de estos puede usarse, según se desee, en la estereoquímica de origen natural o en estereoquímica de origen no natural o una mezcla de las mismas. Por ejemplo, en una realización preferida, el ligando de ácido nucleico está en configuración D, y en una realización alternativa, el ligando de ácido nucleico está en configuración L.

En un aspecto de referencia se proporcionan métodos para identificar los moduladores de ligandos de ácido nucleico. Los moduladores pueden identificarse en general, a través de ensayos de unión, modelado molecular, o ensayos *in vivo* o *in vitro* que miden la modificación de la función biológica. En un aspecto, la unión de un modulador a un ácido nucleico se determina por un ensayo de desplazamiento en gel. En otro aspecto, la unión de un modulador a un ligando de ácido nucleico se determina por un ensayo Biacore. Se describen otros ensayos apropiados en la Descripción Detallada de la Invención.

En otro aspecto, la unión o interacción del modulador con el ligando de ácido nucleico se mide evaluando el efecto del ligando de ácido nucleico con y sin el modulador en condiciones biológicas apropiadas. Como ejemplo, pueden identificarse moduladores de la invención que regulan aptámeros antitrombóticos y anticoagulantes. La eficacia del modulador puede evaluarse *in vitro* o *in vivo* a través de un bioensayo de prueba de coagulación tal como el ensayo del tiempo de coagulación activada, el ensayo de tromboplastina parcial activada, el ensayo de tiempo de hemorragia, el ensayo de tiempo de protrombina, o el ensayo de tiempo de coagulación de trombina. Usando un régimen identificado, puede administrarse a un paciente un ligando de ácido nucleico anticoagulante y después darle el antídoto cuando es el momento apropiado para reanudar la acción coagulante normal. Este régimen es útil, por ejemplo, durante cirugía cardiovascular y vascular, intervenciones coronarias percutáneas (angioplastia), cirugía ortopédica, y tratamiento de infarto de miocardio agudo. En un ejemplo ilustrativo no limitante, los moduladores de la presente invención pueden unirse a ligandos de ácido nucleico que están dirigidos a los complejos enzimáticos de factor tisular (TF)/factor VIIa (FVIIa), factor VIIIa (FIBA)/factor IXa (FIXa), factor Va (FVa)/factor Xa (FXa) y receptores de plaquetas tales como gpIIb/IIIa y gpIb/IX y modular los efectos del ligando de ácido nucleico. Esta invención también proporciona inhibidores plaquetarios, antitrombóticos y fibrinolíticos controlados con antídoto.

En una realización, el modulador es un oligonucleótido que se une a un aptámero contra el Factor IXa (por ejemplo, Aptámero 9.3 o Aptámero 9.3t) que está dirigido al Factor de Coagulación IXa. El antídoto oligonucleotídico puede ser complementario a al menos una parte del aptámero contra el Factor IXa. Específicamente, el antídoto 2'-O-metil oligonucleotídico puede constar de las siguientes secuencias, 5'AUGGGGAGGCAGCAUUA3', 5'CAUGGGGAGGCAGCAUUA3', 5'CAUGGGGAGGCAGCA3', 5'CAUGGGGAGGCA3', 5'GCAUUACGCGUAUAGUCCCCUA3', 5'CGCGUAUAGUCCCCUA3', 5'CGC GGU AUA GUC CCC AU3'. Y modificaciones o derivados de las mismas en las que se mantiene un grado deseado de hibridación.

En otra realización, el modulador es un oligonucleótido que se une a un aptámero contra el Factor Xa (por ejemplo, Aptámero 11F7t) que está dirigido al Factor de Coagulación Xa. El antídoto oligonucleotídico puede ser complementario a al menos una parte del aptámero contra el Factor Xa. Específicamente, el antídoto oligonucleotídico puede constar de las siguientes secuencias, 5'CUCGCUGGGGCUCUC3', 5'UAUUAUCUCGCUGGG3', 5'AAGAGCGGGC CAAG3', 5'GGGCCAAGUAUUAU3', 5'CAAGAGCGGGCCAAG3', 5'CGAGUAUUAUCUUG3' o cualquier modificación o derivado de las mismas en las que se mantiene un grado deseado de hibridación.

En otra realización, los moduladores oligonucleotídicos incluyen secuencias de ácido nucleico que son sustancialmente homólogas a y que tienen sustancialmente la misma actividad para unirse a ligandos de ácido nucleico, que los moduladores oligonucleotídicos identificados en este documento.

5 En otra realización, los moduladores de la invención también pueden usarse para revertir la unión de ligandos de ácido nucleico que albergan restos radiactivos o citotóxicos a tejido diana (por ejemplo, tejido neoplásico) y por lo cual, por ejemplo, facilitan la eliminación de dichos restos del sistema de un paciente. Asimismo, los moduladores de la invención pueden usarse para revertir la unión de ligandos de ácido nucleico marcados con restos detectables (usados, por ejemplo, en formación de imágenes o aislamiento o clasificación celular) a células o tejidos diana (Hicke *et al.*, J. Clin. Invest. 106: 923 (2000); Ringquist *et al.*, Cytometry 33: 394 (1998)). Esta reversión puede usarse para  
10 acelerar la eliminación del resto detectable del sistema de un paciente.

En un aspecto de referencia, los moduladores de la invención también pueden usarse en entornos *in vitro* para potenciar o inhibir el efecto de un ligando de ácido nucleico (por ejemplo, aptámero) sobre una molécula diana. Por ejemplo, los moduladores pueden usarse en estudios de validación de dianas. Usando moduladores de la invención, es posible confirmar que una respuesta observada después de inhibir una molécula diana (con un ligando de ácido nucleico) se debe a la inhibición específica de esa molécula.

Los moduladores de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas que pueden incluir, además del modulador, un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La naturaleza precisa de la composición dependerá, al menos en parte, de la naturaleza del modulador y la vía de administración. Los regímenes de dosificación óptimos puede establecerlos fácilmente un especialista en la técnica y pueden variar con el modulador, el paciente y el efecto buscado. Generalmente, el modulador puede administrarse IV, IM, IP, SC, o por vía tópica, según sea apropiado.

25 Como alternativa, y en vista de la especificidad de los moduladores de la invención, un posterior tratamiento puede implicar la administración de ligandos de ácido nucleico adicionales que sean iguales o diferentes del ligando del par ácido nucleico/antídoto oligonucleotídico original administrado en primer lugar.

30 Finalmente, un aspecto opcional es la identificación y selección de moduladores y reguladores que muestren reactividad cruzada de especie relevante para aumentar la utilidad de estudios preclínicos en animales.

Los objetos y ventajas de la presente invención quedarán claros a partir de la siguiente descripción:

### 35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el aptámero contra el FIXa 9.3t (SEC ID N° 1). Todas las purinas son 2'-hidroxilo nucleótidos y todas las pirimidinas son 2'-fluoro nucleótidos.

40 La Figura 2 muestra la actividad anticoagulante del aptámero 9.3t. El aumento del tiempo de coagulación está normalizado al tiempo de coagulación basal en ausencia de aptámero.

La Figura 3 muestra el cambio del ACT de cerdos después de la inyección de aptámero. Los datos están normalizados a la medida inicial previa a la inyección.

45 La Figura 4 muestra el cambio en el tiempo de coagulación de cerdos después de la inyección de aptámero.

Las Figuras 5A-5C muestran la actividad inhibidora *in vitro* del aptámero modificado con colesterol, 9.3t-C. Fig. 5 A. La adición de colesterol tiene un efecto moderado sobre la afinidad del aptámero 9.3t-C por FIXa. Se usa un ensayo de unión competitiva para medir la afinidad de 9.3t-C por FIXa. Fig. 5B. Actividad anti-coagulante *in vitro* del aptámero 9.3t-C en plasma humano. Fig. 5C. Actividad anticoagulante *in vitro* del aptámero 9.3t-C en plasma de cerdo.

55 Las Figuras 6A-6C muestran la actividad anticoagulante *in vivo* del aptámero 9.3t-C. Fig. 6A. Actividad anticoagulante *in vivo* del aptámero 9.3t-C en cerdos después de inyección IV en embolada, ensayos de ACT (la línea de puntos es los datos de ACT de 9.3t a 0,5 mg/ml de la Fig. 3). Fig. 6B. Actividad anticoagulante *in vivo* del aptámero 9.3t-C en cerdos después de inyección IV en embolada, ensayos de APTT y PT (0,5 mg/kg de 9.3t de la Fig. 4). Fig. 6C. Concentración plasmática *in vivo* de 9.3t-C frente a 9.3t en el tiempo después de inyección IV en embolada. Las concentraciones se calcularon por interpolación a partir de curvas de respuesta a dosis *in vitro* de ensayos de APTT para cada aptámero.

60 La Figura 7 muestra la alineación de aptámeros contra el FIXa mínimos (SEC ID N° 2 - SEC ID N° 17). Las secuencias en letras minúsculas derivan de la región fija de la biblioteca usada en el proceso SELEX y las secuencias en letras mayúsculas derivan de la región aleatoria de la biblioteca usada en el proceso SELEX. S = tronco, L = bucle.

La Figura 8 muestra el análisis en gel nativo de la unión del antídoto oligonucleotídico al aptámero 9.3t. La capacidad del antídoto oligonucleotídico de unirse a y desnaturalizar el aptámero 9.3t se evaluó por electroforesis

## ES 2 351 784 T3

en gel nativo. En resumen, se incubó 9.3t radiomarcado (125 nM) a 37°C durante 15 minutos con (de izquierda a derecha) un exceso molar de factor 8, factor 4, factor 2 o cantidades equimolares del antídoto (A.S.) u oligonucleótido sin sentido (N.S.). El 9.3t nativo migra más rápido que el 9.3t unido a antídoto en este sistema de gel (compárense los carriles 1 y 2).

5 Las Figuras 9A y 9B muestran la reversión por el antídoto oligonucleotídico de la actividad anticoagulante del aptámero 9.3t en plasma humano. Fig. 9A. Cambio en el tiempo de coagulación frente a la concentración de antídoto oligonucleotídico u oligonucleótido sin sentido. Un valor de 1,0 indica ausencia de cambio en el tiempo de coagulación sobre el valor basal. El 9.3tM es una versión mutante del aptámero 9.3t que no tiene actividad anticoagulante. Fig. 9B. Fracción de la actividad anticoagulante del aptámero 9.3t revertida frente al exceso molar de antídoto oligonucleotídico.

10 Las Figuras 10A-10C muestran la especificidad de antídotos oligonucleotídicos. Fig. 10A. Estructura secundaria mínima del aptámero 9.20t (SEC ID N° 18). Fig. 10B. Actividad anticoagulante de 9.20t. Fig. 10C. Especificidad del antídoto oligonucleotídico Anti D1.

La Figura 11 muestra la estructura secundaria del aptámero con un tramo final 9.3t-3NT (SEC ID N° 19). También se muestran antídotos oligonucleotídicos (SEC ID N° 20 - SEC ID N° 22).

20 Las Figuras 12A y 12B muestran la actividad del aptámero 9.3t-3NT. Fig. 12A. Datos de unión competitiva. Fig. 12B. Datos anticoagulantes *in vitro*.

Las Figuras 13A y 13B muestran la reversión *in vitro* de la actividad anticoagulante del aptámero 9.3t-3NT. Fig. 13A. Reversión de la actividad anticoagulante frente a la concentración de antídoto oligonucleotídico. Fig. 13B. Reversión de la actividad anticoagulante frente al exceso molar del antídoto sobre el aptámero.

Las Figuras 14A y 14B muestran el impacto de la adición de un tramo final al aptámero contra el FIXa 9.3t sobre la capacidad de revertir la actividad anticoagulante.

30 Figura 15. El antídoto oligonucleotídico 5-2C pero no una versión mezclada de este antídoto oligonucleotídico, 5-2C scr, revierte de forma eficaz la actividad de los aptámeros 9.3t y Peg-9.3t en plasma humano.

Figura 16. Cinética de la actividad del antídoto en plasma humano, como se describe en el Ejemplo 6.

35 Figura 17. Duración de la actividad del antídoto *in vitro*, como se describe en el Ejemplo 6.

Figuras 18A y 18B. Fig. 18A. Estructura secundaria predicha del aptámero 11F7t (SEC ID N° 23), que se une al factor de coagulación Xa humano con una  $K_D$  de ~1,5 nM. Fig. 18B. Estructura secundaria predicha de una versión mutante del aptámero 11F7t, llamada 11F7tM (SEC ID N° 24).

40 Figuras 19A y 19B. El aptámero 11F7t es un potente anticoagulante del plasma humano. Se añadieron concentraciones variables de aptámero 11F7t a plasma humano *in vitro*, y después se midió el tiempo de coagulación en un ensayo de PT (Fig. 19A) o APTT (Fig. 19B). Todos los datos están normalizados a la medida inicial para ese día, de modo que un valor de 1 equivale a ausencia de cambio en el tiempo de coagulación.

45 Figura 20. Secuencias de 11F7t para las que los antídotos oligonucleotídicos son complementarios.

Figuras 21A y 21B. Fig. 21A. Los antídotos oligonucleotídicos revierten de forma eficaz la actividad del aptámero 11F7t en plasma humano. Fig. 21B. Caracterización de la actividad del antídoto 5-2 sobre un intervalo de concentración más grande de antídoto 5-2, y comparación con la actividad del antídoto de una versión de secuencia mezclada del antídoto 5-2, 5-2 scr.

55 Figura 22. Cinética de la actividad del antídoto en plasma humano. Se añadió aptámero 11F7t a plasma humano *in vitro* a una concentración final 125 nM, y se dejó incubar durante 5 minutos a 37°C. Después se añadió antídoto oligonucleotídico 5-2 a un exceso molar de 1:1 ó 5:1 o no se añadió antídoto, y se determinó la actividad de coagulación del plasma midiendo el tiempo de coagulación en un ensayo de PT en los tiempos indicados después de la adición de antídoto. Se calculó el % de actividad anticoagulante residual restante comparando la diferencia sobre la medida inicial entre el tiempo de coagulación en presencia de antídoto con la diferencia sobre la medida inicial en ausencia de antídoto en cada momento puntual. No se muestran los datos recogidos a un exceso molar de 5:1 de antídoto 5-2 para el aptámero 11F7t, ya que la reversión de la actividad anticoagulante era completa en el primer momento puntual (1 minuto).

60 Figura 23. Duración de la actividad del antídoto *in vitro*. La duración de la inactivación de la actividad anticoagulante del aptámero 11F7t por el antídoto oligonucleotídico 5-2 se midió *in vitro* en plasma humano. En resumen, se añadió 11F7t a plasma humano a una concentración final 125 nM y se dejó incubar durante 5 minutos. Después se añadió antídoto oligonucleotídico 5-2 a un exceso molar de factor 4, o en un experimento paralelo se añadió también solo en lugar del antídoto oligonucleotídico, y se midió el tiempo de coagulación en un ensayo de PT a diversos momentos puntuales después de la adición de antídoto. Todos los datos están normalizados a la medida inicial para ese

## ES 2 351 784 T3

día, de modo que un valor de 1 = ausencia de cambio en el tiempo de coagulación. Se descubrió que después de 5 horas de incubación a 37°C, el PT del plasma no tratado comenzaba a aumentar, lo que indica pérdida de la actividad formadora de coágulos del plasma, y el experimento por tanto se detuvo a las 5 horas.

5      Figura 24. Aptámeros 9.3t y 11F7t y sus antídotos respectivos funcionan de forma independiente entre sí en plasma humano. Apt1 = 9.3t (30 nM), Apt2 = 11F7t (100 nM), AD1 = AO 5-2c (300 nM), AD2 = AO5-2 (500 nM) - las concentraciones finales en plasma están en (). Se añadieron los aptámeros a plasma humano a 37°C como se indica, y se dejaron incubar durante 5 minutos. Después se añadieron los antídotos como se indica, y se midió la actividad de coagulación 10 minutos después de la adición de antídoto en ensayos de APTT. En todos los ensayos, se substituyó el aptámero o el antídoto por tampón solo en casos en los que se añadió solamente un aptámero o un antídoto al plasma. Todos los datos están normalizados a la medida inicial para ese día, de modo que un valor de 1 = ausencia de cambio en el tiempo de coagulación.

15      Figuras 25A-25F. Anticoagulación controlada con antídoto del plasma de pacientes con trombocitopenia inducida por heparina. Fig. 25A-25C. La actividad del aptámero Peg-9.3t y el antídoto 5-2 se ensayó en plasma de pacientes dependientes de hemodiálisis diagnosticados con HIT. Fig. 25D-25F. La actividad del aptámero Peg-9.3t y el antídoto 5-2 se ensayó en plasma de pacientes que padecen complicaciones tromboembólicas de HIT. Las muestras de plasma se trataron como se indica: aptámero, Peg-9.3t 125 nM; antídoto, AO 5-2 1,25  $\mu$ M; aptámero mutante, 9.3tM 125 nM. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 2, Figura 9. Los datos se presentan en segundos (s) y son el promedio  $\pm$  intervalo de mediciones duplicadas.

25      Figuras 26A y B. Anticoagulación controlada con antídoto del plasma de pacientes con trombocitopenia inducida por heparina. La actividad del aptámero 11F7t y el antídoto 5-2 se ensayó en plasma de un paciente dependiente de hemodiálisis diagnosticado con HIT y de un paciente que padecía complicaciones tromboembólicas de HIT. Para el paciente 3, las muestras de plasma se trataron como se indica: aptámero, 11F7t 250 nM; antídoto, AO 5-2 1,0  $\mu$ M; aptámero mutante, 9.3tM 250 nM. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 2, Figura 9. Para el paciente 6, las muestras de plasma se trataron como se indica: aptámero, 11F7t 125 nM; antídoto, AO 5-2 250 nM; aptámero mutante, 9.3tM 125 nM. Los datos se presentan en segundos (s) y son el promedio  $\pm$  intervalo de mediciones duplicadas.

### 30      **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere en líneas generales a moduladores de agentes farmacológicos, incluyendo agentes terapéuticos y de diagnóstico. La invención se refiere adicionalmente a métodos para potenciar o inhibir la eficacia de agentes farmacológicos administrando moduladores de la invención a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que lo necesite. Además, la invención se refiere a métodos para usar moduladores de la invención para evaluar la actividad de ligandos de ácido nucleico, *in vivo* e *in vitro*.

40      La presente invención se refiere a la reversión específica y rápida de la actividad de un ligando de ácido nucleico, por ejemplo, alterando su conformación y por tanto su función. De acuerdo con la invención, el modulador puede ponerse en contacto con el ligando de ácido nucleico marcado como diana en condiciones tales que se una al ligando de ácido nucleico y modifique la interacción entre el ligando de ácido nucleico y su molécula diana. La modificación de esa interacción puede estar provocada por la modificación de la estructura del ligando de ácido nucleico como resultado de la unión por el modulador. El modulador puede unirse al ligando de ácido nucleico libre y/o el ligando de ácido nucleico unido a su molécula diana.

50      Los moduladores de la invención pueden estar diseñados de modo que se unan a cualquier ligando de ácido nucleico particular con un elevado grado de especificidad y un grado deseado de afinidad. Los moduladores están diseñados de modo que, después de la unión, la estructura del ligando de ácido nucleico se modifica en una forma menos activa. Por ejemplo, el modulador puede estar diseñado de modo que después de la unión al ligando de ácido nucleico marcado como diana, la estructura tridimensional de ese ligando de ácido nucleico se altere de modo que el ligando de ácido nucleico ya no pueda unirse a su molécula diana o se una a su molécula diana con menos afinidad.

55      El modulador es un oligonucleótido. El oligonucleótido puede ser una secuencia que es complementaria a al menos una parte del ligando de ácido nucleico. En otra realización, el modulador es una ribozima o ADNzima que está dirigida al ligando de ácido nucleico. En una realización adicional, el modulador puede ser, por ejemplo, un ácido péptido nucleico o ácido morfolino nucleico que incluye una secuencia que es complementaria a o hibrida con al menos una parte del ligando de ácido nucleico. Un modulador puede hibridar específicamente con el ligando de ácido nucleico cuando la unión del modulador al ligando de ácido nucleico interfiere de manera suficiente con la función normal del ligando de ácido nucleico para causar un cambio en la actividad biológica del ligando de ácido nucleico, en condiciones fisiológicas. En una realización alternativa, existe un grado suficiente de unión no de Watson y Crick del modulador al ligando de ácido nucleico para afectar a la actividad del ligando de ácido nucleico.

65      En un aspecto de referencia también se incluyen métodos para identificar moduladores de ligandos de ácido nucleico. En un aspecto, la unión de un modulador a un ácido nucleico se determina por cualquier ensayo que mida la afinidad de unión, tal como un ensayo de desplazamiento en gel. En otro aspecto, la unión de un modulador a un ligando de ácido nucleico se determina por un ensayo Biacore. A continuación se describen otros ensayos ejemplares.

## ES 2 351 784 T3

En otro aspecto, la unión o interacción del modulador con el ligando de ácido nucleico se mide evaluando el efecto del ligando con y sin el regulador en condiciones biológicas apropiadas. Por ejemplo, pueden identificarse moduladores que modifiquen la actividad antitrombótica o anticoagulante del ligando de ácido nucleico *in vitro* o *in vivo* a través de un bioensayo de prueba de coagulación tal como el ensayo de tiempo de coagulación activada, el ensayo de tromboplastina parcial activada, el ensayo de tiempo de hemorragia, el ensayo de tiempo de protrombina, o el ensayo de tiempo de coagulación de trombina.

La presente invención incluye adicionalmente el uso de dichos moduladores en una diversidad de indicaciones por lo cual se desea el control de la actividad del ligando de ácido nucleico. Los moduladores pueden actuar inhibiendo la actividad del ligando de ácido nucleico como un antídoto para revertir las acciones del ligando de ácido nucleico. Además, un aspecto de referencia proporciona métodos para usar moduladores de la invención para evaluar la actividad de ligandos de ácido nucleico. Un aspecto de referencia se refiere a métodos para inhibir la eficacia de ligandos de ácido nucleico administrando moduladores de la invención a mamíferos humanos o no humanos.

En otra realización, los moduladores de la invención también pueden usarse para revertir la unión de ligandos de ácido nucleico que albergan restos radiactivos o citotóxicos a tejido diana y por lo cual, por ejemplo, facilita la eliminación de dichos restos del sistema de un paciente. Asimismo, los moduladores de la invención pueden usarse para revertir la unión de ligandos de ácido nucleico marcados con restos detectables (usados, por ejemplo, en formación de imágenes o aislamiento o clasificación celular) a células o tejidos diana (Hicke *et al.*, J. Clin. Invest. 106: 923 (2000); Ringquist *et al.*, Cytometry 33: 394 (1998)). Esta reversión puede usarse para acelerar la eliminación del resto detectable del sistema de un paciente.

En un aspecto de referencia los moduladores también pueden usarse en entornos *in vitro* para potenciar o inhibir el efecto de un ligando de ácido nucleico (por ejemplo, aptámero) sobre una molécula diana. Por ejemplo, los moduladores pueden usarse en estudios de validación de dianas. Usando los moduladores, es posible confirmar que una respuesta observada después de inhibir una molécula diana (con un ligando de ácido nucleico) se debe a la inhibición específica de esa molécula.

Los moduladores de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas que pueden incluir, además del modulador, un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La naturaleza precisa de la composición dependerá, al menos en parte, de la naturaleza del modulador y la vía de administración. Los regímenes de dosificación óptimos los puede establecer fácilmente un especialista en la técnica y pueden variar con el modulador, el paciente y el efecto buscado. Generalmente, el modulador se administra IV, IM, IP, SC, por vía oral o por vía tópica, según sea apropiado.

En otra realización, el ligando de ácido nucleico o su regulador puede unirse covalentemente a un compuesto lipófilo tal como colesterol, dialquilglicerol, diacilglicerol, o un compuesto de elevado peso molecular no inmunogénico o polímero tal como polietilenglicol (PEG). En estos casos, las propiedades farmacocinéticas del ligando de ácido nucleico o modulador pueden potenciarse. En otras realizaciones más, el ligando de ácido nucleico o el modulador puede estar compuesto, por ejemplo, por un ácido nucleico o PNA o MNA encapsulado en el interior de un liposoma, y se observa captación intracelular potenciada sobre el oligonucleótido o modulador no complejado. El compuesto lipófilo o compuesto de elevado peso molecular no inmunogénico puede unirse covalentemente o asociarse a través de interacciones no covalentes con el(los) ligando(s) o modulador(es). En realizaciones en las que el compuesto lipófilo es colesterol, dialquilglicerol, diacilglicerol, o el compuesto de elevado peso molecular no inmunogénico es PEG, se prefiere una asociación covalente con el(los) modulador(es) oligonucleotídico(s). En realizaciones en las que el compuesto lipófilo es un liposoma catiónico o en las que los moduladores oligonucleotídicos están encapsulados dentro del liposoma, se prefiere una asociación no covalente con el(los) modulador(es) oligonucleotídico(s). En realizaciones en las que se emplea unión covalente, el compuesto lipófilo o compuesto de elevado peso molecular no inmunogénico puede unirse covalentemente a una diversidad de posiciones en el modulador oligonucleotídico, tal como a un grupo amino exocíclico en la base, la posición 5 de un nucleótido de pirimidina, la posición 8 de un nucleótido de purina, el grupo hidroxilo del fosfato, o un grupo hidroxilo u otro grupo en el extremo 5' o 3' del modulador oligonucleotídico. Preferiblemente, sin embargo, se une al grupo hidroxilo 5' o 3' del mismo. La unión del modulador oligonucleotídico a otros componentes del complejo puede hacerse directamente o con la utilización de enlazadores o espaciadores. El compuesto lipófilo o compuesto de elevado peso molecular no inmunogénico puede asociarse a través de interacciones no covalente con el(los) modulador(es) oligonucleotídico(s). Por ejemplo, en una realización de la presente invención, el modulador oligonucleotídico se encapsula dentro del compartimiento interno del compuesto lipófilo. En otra realización de la presente invención, el modulador oligonucleotídico se asocia con el compuesto lipófilo a través de interacciones electrostáticas. Por ejemplo, puede asociarse un liposoma catiónico con un modulador oligonucleotídico aniónico. Otro ejemplo de una interacción no covalente a través de fuerzas iónicas de atracción es uno en el que una parte del modulador oligonucleotídico hibrida a través de apareamiento de bases de Watson y Crick o apareamiento de bases de triple hélice con un oligonucleótido que está asociado con un compuesto lipófilo o compuesto de elevado peso molecular no inmunogénico.

### I. Definiciones

Se cree que los siguientes términos tienen los significados bien reconocidos en la técnica. Sin embargo, se exponen las siguientes definiciones para facilitar la explicación de la invención.

Se entiende que las expresiones “actividad de unión” y “afinidad de unión” se refieren a la tendencia de una molécula ligando a unirse o no unirse a una diana. La energía de dichas interacciones es significativa en la “actividad de unión” y la “afinidad de unión” porque define las concentraciones necesarias de los compañeros de interacción, las velocidades a las que estos compañeros son capaces de asociarse, y las concentraciones relativas de moléculas unidas y libres en una solución. La energética se caracteriza a través de, entre otros modos, la determinación de una constante de disociación,  $K_d$ . Preferiblemente, la  $K_d$  se establece usando un ensayo de unión a filtro de nitrocelulosa de filtro doble tal como el descrito por Wong y Lohman, 1993, *Proc. Natl Acad. Set 'USA* 90, 5428-5432. “Oligonucleótidos de unión específica”, “ligandos de ácido nucleico” o “aptámeros” en una realización de la invención son oligonucleótidos que tienen regiones de unión específicas que son capaces de formar complejos con una molécula diana pretendida. La especificidad de la unión se define en términos de las constantes de disociación comparativas ( $K_d$ ) de un modulador de un ligando de ácido nucleico en comparación con la constante de disociación con respecto a otros materiales en el entorno o moléculas no relacionadas en general. La  $K_d$  para un modulador de un ligando de ácido nucleico puede ser 2 veces, preferiblemente 5 veces, más preferiblemente 10 veces menor que la  $K_d$  con respecto al modulador y el material no relacionado o material adyacente en el entorno. Incluso más preferiblemente, la  $K_d$  será 50 veces menor, más preferiblemente 100 veces menor, y más preferiblemente 200 veces menor.

La  $K_d$  puede determinarse directamente por métodos bien conocidos, y puede calcularse incluso para mezclas complejas por métodos tales como, por ejemplo, los expuestos en Caceci, M., *et al.*, *Byte* (1984) 9: 340-362. Se ha observado, sin embargo, que para algunos oligonucleótidos pequeños, es difícil la determinación directa de  $K_d$ , y puede conducir a resultados elevados de forma errónea. En estas circunstancias, puede realizarse un ensayo de unión competitiva para la molécula diana u otra sustancia candidata con respecto a sustancias que se sabe que se unen a la diana o candidato. El valor de la concentración a la que sucede una inhibición del 50% ( $K_i$ ) es, en condiciones ideales, equivalente a  $K_d$ . Sin embargo, en ningún caso  $K_i$  será menor que  $K_d$ . Por tanto, la determinación de  $K_i$ , en una alternativa, establece un valor máximo para el valor de  $K_d$ . En esas circunstancias en las que las dificultades técnicas descartan la medición precisa de  $K_d$ , la medición de  $K_i$  puede sustituirse convenientemente para proporcionar un límite superior para  $K_d$ . También puede usarse un valor de  $K_i$  para confirmar que un modulador se une a un ligando de ácido nucleico.

Como la especificidad se define en términos de  $K_d$  como se ha expuesto anteriormente, en ciertas realizaciones de la presente invención se prefiere excluir de las categorías de materiales no relacionados y materiales adyacentes a la diana en el entorno de la diana aquellos materiales que están suficientemente relacionados con la diana que son reactivos de forma cruzada inmunológicamente con la misma. Por “reactiva de forma cruzada inmunológicamente” se entiende que anticuerpos creados con respecto a la diana reaccionan de forma cruzada en condiciones de ensayo convencionales con el material candidato. Generalmente, para que los anticuerpos reaccionen de forma cruzada en ensayos convencionales, las afinidades de unión de los anticuerpos para materiales de reactividad cruzada en comparación con las dianas deben estar en el intervalo de 5 veces a 100 veces, generalmente aproximadamente 10 veces.

En el contexto de esta invención, “hibridación” significa enlace de hidrógeno, que puede ser enlace de hidrógeno de Watson y Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen inverso, entre bases nucleosídicas o nucleotídicas complementarias. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleobases complementarias que aparean a través de la formación de enlaces de hidrógeno. “Complementario” como se usa en este documento, se refiere a la capacidad de un apareamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una cierta posición de un oligonucleótido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces el oligonucleótido y el ADN o ARN se consideran complementarios entre sí en esa posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando una cantidad suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula está ocupada por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por tanto, “que puede hibridar específicamente” y “complementario” son expresiones que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad o apareamiento preciso tal que sucede unión estable y específica entre el oligonucleótido y el ADN o ARN diana. Se entiende en la técnica que la secuencia del compuesto no tiene que ser 100% complementaria a la de su ácido nucleico diana para que pueda hibridar específicamente. Un compuesto puede hibridar específicamente cuando la unión del compuesto a la molécula de ácido nucleico diana impide la función normal del ácido nucleico diana para causar un cambio en la utilidad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar una unión no específica del compuesto con secuencias no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

“Oligómeros” u “oligonucleótidos” incluyen secuencias de ARN o ADN o mezclas o análogos de las mismas, de más de un nucleótido en forma de cadena sencilla o dúplex e incluyen específicamente secuencias cortas tales como dímeros y trímeros, en forma de cadena sencilla o dúplex, que pueden ser intermedios en la producción de los oligonucleótidos de unión específica. Las formas “modificadas” usadas en combinaciones candidatas contienen al menos un resto no nativo.

Se entiende que la expresión “análogo de ARN” se refiere a una molécula polimérica que puede contener uno o más nucleótidos que tienen un sustituyente no de hidrógeno diferente a un grupo hidroxilo en la posición 2', y por ejemplo, puede contener al menos uno de los siguientes: 2'-desoxi, 2'-halo (incluyendo 2'-fluoro), 2'-amino (preferiblemente no sustituido o mono o disustituido), 2'-mono-, di- o tri-halometilo, 2'-O-alquilo (incluyendo 2'-O-metilo u O-etilo), alquilo 2'-O-halo-sustituido, 2'-alquilo, azido, fosforotioato, sulfhidrilo, metilfosfonato, fluoresceína, rodamina, pireno, biotina, xantina, hipoxantina, 2,6-diaminopurina, 2-hidroxi-6-mercaptapurina y bases de pirimidina sustituidas en

la posición 6 con azufre o la posición 5 con halo o grupos alquilo C<sub>1-5</sub>, enlazadores básicos, 3'-desoxiadenosina así como otros análogos "terminadores de cadena" o "no extensibles" disponibles (en el extremo 3' del ARN), o marcadores tales como <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P y similares. Todo lo anterior puede incorporarse en un ARN usando las técnicas de síntesis convencionales descritas en este documento.

5

Como se usa en este documento, una "diana" o "molécula diana" se refiere a una biomolécula que es el objetivo de una estrategia de fármaco terapéutico o ensayo de diagnóstico, incluyendo, sin limitación, enzimas, inhibidores enzimáticos, hormonas, glicoproteínas, lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, proteínas intracelulares, extracelulares, y de superficie celular, péptidos, carbohidratos, incluyendo glucosaminoglucanos, lípidos, incluyendo glucolípidos y ciertos oligonucleótidos, y generalmente, cualquier biomolécula capaz de activar o desactivar una vía bioquímica o modularla, o que esté implicada en una respuesta biológica predecible. Las dianas pueden estar libres en solución, como la trombina, o asociadas con células o virus, como en receptores o proteínas de envuelta. Cualquier molécula que sea de suficiente tamaño para reconocerse específicamente por un ligando de ácido nucleico puede usarse como diana. Por tanto, pueden usarse estructuras de membrana, receptores, orgánulos, y similares como dianas de complejación.

15

Un "aptámero de ARN" es un aptámero que comprende unidades ribonucleosídicas. También se entiende que "aptámero de ARN" abarca análogos de ARN como se ha definido anteriormente en este documento.

20

Se entiende que la expresión "aptámero contra factores de coagulación" se refiere a un ácido nucleico monocatenario que se une a un factor de coagulación y modula su función. Se entiende que la expresión "factor de coagulación" se refiere a un factor que actúa en la cascada de coagulación intrínseca o extrínseca o ambas.

25

Como se usa en este documento, "secuencia consenso" se refiere a una secuencia de nucleótidos o región (que puede estar compuesta o no de nucleótidos contiguos) que se encuentra en una o más regiones de al menos dos secuencias de ácido nucleico. Una secuencia consenso puede ser tan corta como de tres nucleótidos de longitud. También puede estar compuesta de una o más secuencias no contiguas, con secuencias de nucleótidos o polímeros de hasta cientos de bases de longitud intercaladas entre las secuencias consenso. Las secuencias consenso pueden identificarse por comparaciones de secuencia entre especies de ácidos nucleicos individuales, pudiendo estar asistidas dichas comparaciones por programas informáticos y otros, herramientas para el modelado de la estructura secundaria o terciaria a partir de la información de secuencia. Generalmente, la secuencia consenso contendrá al menos aproximadamente de 3 a 20 nucleótidos, más comúnmente de 6 a 10 nucleótidos.

30

Se entiende que las expresiones "enfermedad cardiovascular" y "enfermedades cardiovasculares" se refieren a cualquier enfermedad cardiovascular como entendería un especialista en la técnica. Los ejemplos no limitantes de enfermedades cardiovasculares particularmente contempladas incluyen, aunque sin limitación, aterosclerosis, trombofilia, embolias, infarto cardiaco (por ejemplo, infarto de miocardio), trombosis, angina, apoplejía, choque séptico, hipertensión, hipercolesterolemia, reestenosis y diabetes.

35

Se entiende que el término "aproximadamente", como se usa en este documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad de peso, tiempo, dosis etc., abarca variaciones de  $\pm$  el 20% o  $\pm$  el 10%, más preferiblemente  $\pm$  el 5%, incluso más preferiblemente  $\pm$  el 1%, y aún más preferiblemente  $\pm$  el 0,1% de la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar el método descrito.

40

Los compuestos de la presente invención que tienen un centro quiral pueden existir en y aislarse en formas ópticamente activas y racémicas. Algunos compuestos pueden mostrar polimorfismo. La presente invención abarca formas racémicas, ópticamente activas, polimórficas, o estereoisoméricas, o mezclas de las mismas, de un compuesto de la invención, que tienen las propiedades útiles descritas en este documento. Las formas ópticamente activas pueden prepararse, por ejemplo, por resolución de la forma racémica por técnicas de recristalización, por síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, por síntesis quiral, o por separación cromatográfica usando una fase estacionaria quiral o por resolución enzimática. En una realización preferida, los compuestos se usan en formas de origen natural. Sin embargo, como alternativa, los compuestos pueden usarse en una forma de origen no natural.

50

## II. *Ligandos de Ácido Nucleico*

55

Un "ligando de ácido nucleico" como se usa en este documento es un aptámero contra factores de coagulación como se ha definido anteriormente. Una acción deseable incluye, aunque sin limitación, la unión de la diana, el cambio catalítico de la diana, la reacción con la diana de un modo que modifique la diana o la actividad funcional de la diana, la unión covalente a la diana como en un inhibidor suicida, o la facilitación de la reacción entre la diana y otra molécula. En la realización preferida, la acción es la unión específica con afinidad por una molécula diana, siendo dicha molécula diana una estructura química tridimensional, donde el ligando de ácido nucleico no es un ácido nucleico que tiene la función fisiológica conocida de unirse por la molécula diana. En una realización de la invención, los ligandos de ácido nucleico se identifican usando la metodología SELEX. Los ligandos de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos que se identifican a partir de una mezcla de candidatos de ácidos nucleicos, donde el ligando de ácido nucleico es un ligando de una diana dada, por el método que comprende a) poner en contacto la mezcla de candidatos con la diana, donde los ácidos nucleicos que tienen una afinidad aumentada por la diana con relación a la mezcla de candidatos pueden separarse del resto de la mezcla de candidatos; b) separar los ácidos nucleicos de afinidad aumentada del resto

65

de la mezcla de candidatas; y c) amplificar los ácidos nucleicos de afinidad aumentada para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida con ligando. Como se usa en este documento, ligando de ácido nucleico o aptámero se refiere a secuencias tanto singulares como plurales de ácidos nucleicos que son capaces de unirse a una proteína u otra molécula, y por lo cual se altera la función de la proteína u otra molécula.

Los ligandos de ácido nucleico pueden prepararse con nucleótidos que albergan estequiometría D o L, o una mezcla de los mismos. Los nucleósidos de origen natural están en configuración D. Los aptámeros se han preparado a partir de L-nucleótidos, y se llaman L-aptámeros. Los ligandos de ácido nucleico usados para propósitos terapéuticos están típicamente en configuración D, pero pueden mostrar cualquier configuración que proporcione el efecto deseado. Típicamente, cuando los ligandos de ácido nucleico que comprenden L-nucleótidos son la diana de un modulador oligonucleotídico, el modulador también comprende L-nucleótidos (véase, por ejemplo, el documento USP 5.780.221).

Los ligandos de ácido nucleico preferiblemente comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos, ya que oligonucleótidos de una longitud que esté dentro de estos intervalos se preparan fácilmente por técnicas convencionales. En una realización, los aptámeros o moduladores oligonucleotídicos pueden comprender un mínimo de aproximadamente 6 nucleótidos, preferiblemente 10, y más preferiblemente 14 ó 15 nucleótidos, que son necesarios para realizar la unión específica. Las únicas limitaciones aparentes sobre la especificidad de unión de los pares diana/oligonucleótido de la invención se refieren a una secuencia suficiente para que sea distintiva en el oligonucleótido de unión y suficiente capacidad de unión de la sustancia diana para obtener la interacción necesaria. Aptámeros contra regiones de unión que contienen secuencias más cortas que 10, por ejemplo, 6 unidades, son posibles si puede obtenerse la interacción apropiada en el contexto del entorno en el que la diana está situada. Por tanto, si hay poca interferencia por otros materiales, puede requerirse menos especificidad y menos fuerza de unión.

Los ligandos de ácido nucleico y métodos para su producción y uso, se describen, por ejemplo, en las siguientes patentes de Estados Unidos. Cualquiera de los ligandos de ácido nucleico descritos en las patentes enumeradas a continuación u otras patentes, o cualquier ligando de ácido nucleico descrito en las publicaciones así como otros ligandos de ácido nucleico deseados usados en terapia médica pueden modularse o regularse de acuerdo con la presente invención. La Patente de Estados Unidos N° 6.387.635, titulada 2'-fluoropyrimidine anti-calf intestinal phosphatase nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 6.387.620, titulada Transcription-free selex; la Patente de Estados Unidos N° 6.379.900, titulada Compositions and methods of use of 8-nitroguanine; la Patente de Estados Unidos N° 6.376.474, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: tissue SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 6.376.190, titulada Modified SELEX processes without purified protein; la Patente de Estados Unidos N° 6.355.787, titulada Purine nucleoside modifications by palladium catalyzed methods and compounds produced; la Patente de Estados Unidos N° 6.355.431, titulada Detection of nucleic acid amplification reactions using bead arrays; la Patente de Estados Unidos N° 6.346.611, titulada High affinity TGF $\beta$  nucleic acid ligands and inhibitors; la Patente de Estados Unidos N° 6.344.321, titulada Nucleic acid ligands which bind to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) or its receptor c-met; la Patente de Estados Unidos N° 6.344.318, titulada Methods of producing nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 6.331.398, titulada Nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 6.331.394, titulada Nucleic acid ligands to integrins; la Patente de Estados Unidos N° 6.329.145, titulada Determining non-nucleic acid molecule binding to target by competition with nucleic acid ligand; la Patente de Estados Unidos N° 6.306.598, titulada Nucleic acid-coupled colorimetric analyte detectors; la Patente de Estados Unidos N° 6.303.316, titulada Organic semiconductor recognition complex and system; la Patente de Estados Unidos N° 6.300.074, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Chemi-SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 6.291.184, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: phoseselection of nucleic acid ligands and solution selex; la Patente de Estados Unidos N° 6.287.765, titulada Methods for detecting and identifying single molecules; la Patente de Estados Unidos N° 6.280.943, titulada 2'-fluoropyrimidine anti-calf intestinal phosphatase nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 6.280.932, titulada High affinity nucleic acid ligands to lectins; la Patente de Estados Unidos N° 6.264.825, titulada Binding acceleration techniques for the detection of analytes; la Patente de Estados Unidos N° 6.261.783, titulada Homogeneous detection of a target through nucleic acid ligand-ligand beacon interaction; la Patente de Estados Unidos N° 6.261.774, titulada Truncation selex method; la Patente de Estados Unidos N° 6.242.246, titulada Nucleic acid ligand diagnostic Biochip; la Patente de Estados Unidos N° 6.232.071, titulada Tenascin-C nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 6.229.002, titulada Platelet derived growth factor (PDGF) nucleic acid ligand complexes; la Patente de Estados Unidos N° 6.225.063, titulada RNA channels in biological membranes; la Patente de Estados Unidos N° 6.207.816, titulada High affinity oligonucleotide ligands to growth factors; la Patente de Estados Unidos N° 6.207.388, titulada Compositions, methods, kits and apparatus for determining the presence or absence of target molecules; la Patente de Estados Unidos N° 6.184.364, titulada High affinity nucleic acid ligands containing modified nucleotides; la Patente de Estados Unidos N° 6.183.967, titulada Nucleic acid ligand inhibitors to DNA polimerases; la Patente de Estados Unidos N° 6.180.348, titulada Method of isolating target specific oligonucleotide ligands; la Patente de Estados Unidos N° 6.177.557, titulada High affinity ligands of basic fibroblast growth factor and thrombin; la Patente de Estados Unidos N° 6.177.555, titulada Homogeneous detection of a target through nucleic acid ligand-ligand beacon interaction; la Patente de Estados Unidos N° 6.171.795, titulada Nucleic acid ligands to CD40 ligand; la Patente de Estados Unidos N° 6.168.778, titulada Vascular endothelial growth factor (VEGF) Nucleic Acid Ligand Complexes; la Patente de Estados Unidos N° 6.147.204, titulada Nucleic acid ligand complexes; la Patente de Estados Unidos N° 6.140.490, titulada High affinity nucleic acid ligands of complement system proteins; la Patente de Estados Unidos N° 6.127.119, titulada Nucleic acid ligands of tissue target; la Patente de

## ES 2 351 784 T3

Estados Unidos N° 6.124.449, titulada High affinity TGF $\beta$  nucleic acid ligands and inhibitors; la Patente de Estados Unidos N° 6.114.120, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: tissue selex; la Patente de Estados Unidos N° 6.110.900, titulada Nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 6.083.696, titulada Systematic evolution of ligands exponential enrichment: blended selex; la Patente de Estados Unidos N° 6.080.585, titulada  
5 Methods for discovering ligands; la Patente de Estados Unidos N° 6.051.698, titulada Vascular endothelial growth factor (VEGF) nucleic acid ligand complexes; la Patente de Estados Unidos N° 6.048.698, titulada Parallel SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 6.030.776, titulada Parallel SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 6.028.186, titulada High affinity nucleic acid ligands of cytokines; la Patente de Estados Unidos N° 6.022.691, titulada Determination of oligonucleotides for therapeutics, diagnostics and research reagents; la Patente de Estados Unidos N° 6.020.483, titu-  
10 lada Nucleoside modifications by palladium catalyzed methods; la Patente de Estados Unidos N° 6.020.130, titulada Nucleic acid ligands that bind to and inhibit DNA polimerases; la Patente de Estados Unidos N° 6.013.443, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: tissue SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 6.011.020, titulada Nucleic acid ligand complexes; la Patente de Estados Unidos N° 6.001.988, titulada High affinity nucleic acid ligands to lectins; la Patente de Estados Unidos N° 6.001.577, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: photoselection of nucleic acid ligands and solution selex; la Patente de Estados Unidos N° 6.001.570, titu-  
15 lada Compositions, methods, kits and apparatus for determining the presence or absence of target molecules; la Patente de Estados Unidos N° 5.998.142, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: chemi-SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 5.989.823, titulada Homogeneous detection of a target through nucleic acid ligand-ligand beacon interaction; la Patente de Estados Unidos N° 5.972.599, titulada High affinity nucleic acid ligands of cytokines; la Patente de Estados Unidos N° 5.962.219, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: chemi-selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.958.691, titulada High affinity nucleic acid ligands containing modified nucleotides; la Patente de Estados Unidos N° 5.874.557, titulada Nucleic acid ligand inhibitors to DNA poli-  
20 merases; la Patente de Estados Unidos N° 5.874.218, titulada Method for detecting a target compound in a substance using a nucleic acid ligand; la Patente de Estados Unidos N° 5.871.924, titulada Method for the production of ligands capable of facilitating aminoacyl-RNA synthesis; la Patente de Estados Unidos N° 5.869.641, titulada High affinity nucleic acid ligands of CD4; la Patente de Estados Unidos N° 5.864.026, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: tissue selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.861.254, titulada Flow cell SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 5.859.228, titulada Vascular endothelial growth factor (VEGF) nucleic acid ligand complexes; la Patente de Estados Unidos N° 5.858.660, titulada Parallel selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.853.984, titu-  
30 lada Use of nucleic acid ligands in flow cytometry; la Patente de Estados Unidos N° 5.849.890, titulada High affinity oligonucleotide ligands to chorionic gonadotropin hormone and related glicoprotein hormones; la Patente de Estados Unidos N° 5.849.479, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to vascular endothelial growth factor (VEGF); la Patente de Estados Unidos N° 5.846.713, titulada High affinity HKGF nucleic acid ligands and inhibitors; la Patente de Estados Unidos N° 5.843.653, titulada Method for detecting a target molecule in a sample using a nucleic acid ligand; la Patente de Estados Unidos N° 5.837.834, titulada High affinity HKGF nucleic acid ligands and inhibitors; la Patente de Estados Unidos N° 5.837.456, titulada High affinity oligonucleotide ligands to chorionic gonadotropin hormone and related glicoprotein hormones; la Patente de Estados Unidos N° 5.834.199, titulada Methods of iden-  
35 tifying transition metal complexes that selectively cleave regulatory elements of mRNA and uses thereof; la Patente de Estados Unidos N° 5.817.785, titulada Methods of producing nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.811.533, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to vascular endothelial growth factor (VEGF); la Patente de Estados Unidos N° 5.795.721, titulada High affinity nucleic acid ligands of ICP4; la Patente de Estados Unidos N° 5.789.163, titulada Enzyme linked oligonucleotide assays (ELONAS); la Patente de Estados Unidos N° 5.789.160, titulada Parallel selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.789.157, titulada Systematic evolution of ligands by expo-  
40 nential enrichment: tissue selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.786.462, titulada High affinity ssDNA ligands of HIV-1 reverse transcriptase; la Patente de Estados Unidos N° 5.780.228, titulada High affinity nucleic acid ligands to lectins; la Patente de Estados Unidos N° 5.773.598, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: chimeric selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.766.853, titulada Method for identification of high affinity nucleic acid ligands to selectins; la Patente de Estados Unidos N° 5.763.595, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Chemi-SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 5.763.566, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: tissue SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 5.763.177, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: photoselection of nucleic acid ligands and solution selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.763.173, titulada Nucleic acid ligand inhibitors to DNA polimerases; la Patente de Estados Unidos N° 5.756.287, titulada High affinity HIV integrase inhibitors; la Patente de Estados Unidos N° 5.750.342, titu-  
45 lada Nucleic acid ligands of tissue target; la Patente de Estados Unidos N° 5.734.034, titulada Nucleic acid ligand inhibitors of human neutrophil elastase; la Patente de Estados Unidos N° 5.731.424, titulada High affinity TGF $\beta$  nucleic acid ligands and inhibitors; la Patente de Estados Unidos N° 5.731.144, titulada High affinity TGF $\beta$  nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.726.017, titulada High affinity HIV-1 gag nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.723.594, titulada High affinity PDGF nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.723.592, titulada Parallel selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.723.289, titulada Parallel selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.712.375, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: tissue selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.707.796, titulada Method for selecting nucleic acids on the basis of structure; la Patente de Estados Unidos N° 5.705.337, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: chemi-  
50 SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 5.696.249, titulada Nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.693.502, titulada Nucleic acid ligand inhibitors to DNA polimerases; la Patente de Estados Unidos N° 5.688.935, titulada Nucleic acid ligands of tissue target; la Patente de Estados Unidos N° 5.686.592, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to immunoglobulin E (IgE); la Patente de Estados Unidos N° 5.686.242, titulada Determination of oligonucleotides for therapeutics, diagnostics and research reagents; la Patente de Estados Unidos N° 5.683.867, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: blended SELEX; la Patente de Estados Unidos

## ES 2 351 784 T3

Nº 5.674.685, titulada High affinity PDGF nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos Nº 5.670.637, titulada Nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos Nº 5.668.264, titulada High affinity PDGF nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos Nº 5.663.064, titulada Ribozymes with RNA protein binding site; la Patente de Estados Unidos Nº 5.660.985, titulada High affinity nucleic acid ligands containing modified nucleotides; la Patente de Estados Unidos Nº 5.654.151, titulada High affinity HIV Nucleocapsid nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos Nº 5.650.275, titulada Target detection method using spectroscopically detectable nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos Nº 5.648.214, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to the tachykinin substance P; la Patente de Estados Unidos Nº 5.641.629, titulada Spectroscopically detectable nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos Nº 5.639.868, titulada High-affinity RNA ligands for basic fibroblast growth factor; la Patente de Estados Unidos Nº 5.637.682, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to the tachykinin substance P; la Patente de Estados Unidos Nº 5.637.461, titulada Ligands of HIV-1 TAT protein; la Patente de Estados Unidos Nº 5.637.459, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: chimeric selex; la Patente de Estados Unidos Nº 5.635.615, titulada High affinity HIV nucleocapsid nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos Nº 5.629.155, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to immunoglobulin E (IgE); la Patente de Estados Unidos Nº 5.622.828, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to secretory phospholipase A2 (sPLA.sub.2); la Patente de Estados Unidos Nº 5.595.877, titulada Methods of producing nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos Nº 5.587.468, titulada High affinity nucleic acid ligands to HIV integrase; la Patente de Estados Unidos Nº 5.580.737, titulada High-affinity nucleic acid ligands that discriminate between theophylline and caffeine; la Patente de Estados Unidos Nº 5.567.588, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Solution SELEX; la Patente de Estados Unidos Nº 5.543.293, titulada DNA ligands of thrombin; la Patente de Estados Unidos Nº 5.527.894, titulada Ligands of HIV-1 tat protein; la Patente de Estados Unidos Nº 5.475.096, titulada Nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos Nº 5.866.334, titulada Determination and identification of active compounds in a compound library; la Patente de Estados Unidos Nº 5.864.026, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: tissue selex; la Patente de Estados Unidos Nº 5.861.254, titulada Flow cell SELEX; la Patente de Estados Unidos Nº 5.859.228, titulada Vascular endothelial growth factor (VEGF) nucleic acid ligand complexes; la Patente de Estados Unidos Nº 5.858.660, titulada Parallel selex; la Patente de Estados Unidos Nº 5.853.984, titulada Use of nucleic acid ligands in flow cytometry; la Patente de Estados Unidos Nº 5.849.890, titulada High affinity oligonucleotide ligands to chorionic gonadotropin hormone and related glycoprotein hormones; la Patente de Estados Unidos Nº 5.849.479, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to vascular endothelial growth factor (VEGF); la Patente de Estados Unidos Nº 5.846.713, titulada High affinity HKGF nucleic acid ligands and inhibitors; la Patente de Estados Unidos Nº 5.843.732, titulada Method and apparatus for determining consensus secondary structures for nucleic acid sequences; la Patente de Estados Unidos Nº 5.843.653, titulada Method for detecting a target molecule in a sample using a nucleic acid ligand; la Patente de Estados Unidos Nº 5.840.867, titulada Aptamer analogs specific for biomolecules; la Patente de Estados Unidos Nº 5.840.580, titulada Phenotypic characterization of the hematopoietic stem cell; la Patente de Estados Unidos Nº 5.837.838, titulada Bax inhibitor proteins; la Patente de Estados Unidos Nº 5.837.834, titulada High affinity HKGF nucleic acid ligands and inhibitors; la Patente de Estados Unidos Nº 5.837.456, titulada High affinity oligonucleotide ligands to chorionic gonadotropin hormone and related glycoprotein hormones; la Patente de Estados Unidos Nº 5.834.199, titulada Methods of identifying transition metal complexes that selectively cleave regulatory elements of mRNA and uses thereof; la Patente de Estados Unidos Nº 5.834.184, titulada *In vivo* selection of RNA-binding peptides; la Patente de Estados Unidos Nº 5.817.785, titulada Methods of producing nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos Nº 5.811.533, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to vascular endothelial growth factor (VEGF); la Patente de Estados Unidos Nº 5.804.390, titulada Use of nuclear magnetic resonance to identify ligands to target biomolecules; la Patente de Estados Unidos Nº 5.795.721, titulada High affinity nucleic acid ligands of ICP4; la Patente de Estados Unidos Nº 5.789.163, titulada Enzyme linked oligonucleotide assays (ELONAS); la Patente de Estados Unidos Nº 5.789.160, titulada Parallel selex; la Patente de Estados Unidos Nº 5.789.157, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: tissue selex; la Patente de Estados Unidos Nº 5.786.462, titulada High affinity ssDNA ligands of HIV-1 reverse transcriptase; la Patente de Estados Unidos Nº 5.786.203, titulada Isolated nucleic acid encoding corticotropin-releasing factor.sub.2 receptors; la Patente de Estados Unidos Nº 5.786.145, titulada Oligonucleotide competitors for binding of HIV RRE to REV protein and assays for screening inhibitors of this binding; la Patente de Estados Unidos Nº 5.783.566, titulada Method for increasing or decreasing transfection efficiency; la Patente de Estados Unidos Nº 5.780.610, titulada Reduction of nonspecific hybridization by using novel base-pairing schemes; la Patente de Estados Unidos Nº 5.780.228, titulada High affinity nucleic acid ligands to lectins; la Patente de Estados Unidos Nº 5.773.598, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: chimeric selex; la Patente de Estados Unidos Nº 5.770.434, titulada Soluble peptides having constrained, secondary conformation in solution and method of making same; la Patente de Estados Unidos Nº 5.766.853, titulada Method for identification of high affinity nucleic acid ligands to selectins; la Patente de Estados Unidos Nº 5.763.595, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Chemi-SELEX; la Patente de Estados Unidos Nº 5.763.566, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: tissue SELEX; la Patente de Estados Unidos Nº 5.763.177, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: photoselection of nucleic acid ligands and solution selex; la Patente de Estados Unidos Nº 5.763.173, titulada Nucleic acid ligand inhibitors to DNA polymerases; la Patente de Estados Unidos Nº 5.756.296, titulada Nucleotide-directed assembly of bimolecular and multimolecular drugs and devices; la Patente de Estados Unidos Nº 5.756.291, titulada Aptamers specific for biomolecules and methods of making; la Patente de Estados Unidos Nº 5.756.287, titulada High affinity HIV integrase inhibitors; la Patente de Estados Unidos Nº 5.750.342, titulada Nucleic acid ligands of tissue target; la Patente de Estados Unidos Nº 5.739.305, titulada Nucleotide-directed assembly of bimolecular and multimolecular drugs and devices; la Patente de Estados Unidos Nº 5.734.034, titulada Nucleic acid ligand inhibitors of human neutrophil elastase; la Patente de Estados Unidos Nº 5.733.732, titulada Methods for detecting primary adhalinopathy; la Patente de Estados Unidos Nº 5.731.424, titulada High affinity TGF.beta. nucleic acid ligands and inhibitors; la Patente de Estados Unidos Nº 5.731.144, titulada High affinity TGF.beta. nu-

cleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.726.017, titulada High affinity HIV-1 gag nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.726.014, titulada Screening assay for the detection of DNA-binding molecules; la Patente de Estados Unidos N° 5.723.594, titulada High affinity PDGF nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.723.592, titulada Parallel selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.723.289, titulada Parallel selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.712.375, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: tissue selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.707.796, titulada Method for selecting nucleic acids on the basis of structure; la Patente de Estados Unidos N° 5.705.337, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: chemi-SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 5.698.442, titulada DNA encoding an 18 Kd CDK6 inhibiting protein; la Patente de Estados Unidos N° 5.698.426, titulada Surface expression libraries of heteromeric receptors; la Patente de Estados Unidos N° 5.698.401, titulada Use of nuclear magnetic resonance to identify ligands to target biomolecules; la Patente de Estados Unidos N° 5.693.502, titulada Nucleic acid ligand inhibitors to DNA polymerases; la Patente de Estados Unidos N° 5.688.935, titulada Nucleic acid ligands of tissue target; la Patente de Estados Unidos N° 5.688.670, titulada Self-modifying RNA molecules and methods of making; la Patente de Estados Unidos N° 5.686.592, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to immunoglobulin E (IgE); la Patente de Estados Unidos N° 5.683.867, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: blended SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 5.681.702, titulada Reduction of nonspecific hybridization by using novel base-pairing schemes; la Patente de Estados Unidos N° 5.674.685, titulada High affinity PDGF nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.670.637, titulada Nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.668.265, titulada Bi-directional oligonucleotides that bind thrombin; la Patente de Estados Unidos N° 5.668.264, titulada High affinity PDGF nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.660.985, titulada High affinity nucleic acid ligands containing modified nucleotides; la Patente de Estados Unidos N° 5.660.855, titulada Lipid constructs for targeting to vascular smooth muscle tissue; la Patente de Estados Unidos N° 5.658.738 titulada Bi-directional oligonucleotides that bind thrombin; la Patente de Estados Unidos N° 5.656.739 titulada Nucleotide-directed assembly of bimolecular and multimolecular drugs and devices; la Patente de Estados Unidos N° 5.656.467, titulada Methods and materials for producing gene libraries; la Patente de Estados Unidos N° 5.654.151, titulada High affinity HIV Nucleocapsid nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.650.275, titulada Target detection method using spectroscopically detectable nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.648.214, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to the tachykinin substance P; la Patente de Estados Unidos N° 5.641.629, titulada Spectroscopically detectable nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.639.868, titulada High-affinity RNA ligands for basic fibroblast growth factor; la Patente de Estados Unidos N° 5.639.428, titulada Method and apparatus for fully automated nucleic acid amplification, nucleic acid assay and immunoassay; la Patente de Estados Unidos N° 5.637.682, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to the tachykinin substance P; la Patente de Estados Unidos N° 5.637.459, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: chimeric selex; la Patente de Estados Unidos N° 5.635.615, titulada High affinity HIV nucleocapsid nucleic acid ligands; la Patente de Estados Unidos N° 5.631.156, titulada DNA encoding and 18 KD CDK6 inhibiting protein; la Patente de Estados Unidos N° 5.631.146, titulada DNA aptamers and catalysts that bind adenosine or adenosine-5'-phosphates and methods for isolation thereof; la Patente de Estados Unidos N° 5.629.407, titulada DNA encoding an 18 KD CDK6 inhibiting protein and antibodies thereto; la Patente de Estados Unidos N° 5.629.155, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to immunoglobulin E (IgE); la Patente de Estados Unidos N° 5.622.828, titulada High-affinity oligonucleotide ligands to secretory phospholipase A2 (sPLA.sub.2); la Patente de Estados Unidos N° 5.621.082, titulada DNA encoding an 18 Kd CDK6 inhibiting protein; la Patente de Estados Unidos N° 5.599.917, titulada Inhibition of interferon-gamma with oligonucleotides; la Patente de Estados Unidos N° 5.597.696, titulada Covalent cyanine dye oligonucleotide conjugates; la Patente de Estados Unidos N° 5.587.468, titulada High affinity nucleic acid ligands to HIV integrase; la Patente de Estados Unidos N° 5.585.269, titulada Isolated DNA encoding c-myc protooncogene; la Patente de Estados Unidos N° 5.580.737, titulada High-affinity nucleic acid ligands that discriminate between theophylline and caffeine; la Patente de Estados Unidos N° 5.567.588, titulada Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Solution SELEX; la Patente de Estados Unidos N° 5.565.327, titulada Methods of diagnosing parasitic infections and of testing drug susceptibility of parasites; la Patente de Estados Unidos N° 5.527.894, titulada Ligands of HIV-1 tat protein; la Patente de Estados Unidos N° 5.512.462, titulada Methods and reagents for the polymerase chain reaction amplification of long DNA sequences; la Patente de Estados Unidos N° 5.503.978, titulada Method for identification of high affinity DNA ligands of HIV-1 reverse transcriptase; la Patente de Estados Unidos N° 5.472.841, titulada Methods for identifying nucleic acid ligands of human neutrophil elastase; y la Patente de Estados Unidos N° 5.459.015, titulada High-affinity RNA ligands of basic fibroblast growth factor.

### III. Tipos de Moduladores

Los moduladores (es decir, reguladores) de la invención son moduladores oligonucleotídicos farmacéuticamente aceptables que pueden unirse a un ligando de ácido nucleico y modificar la interacción entre ese ligando y su molécula diana (por ejemplo, modificando la estructura del aptámero) del modo descrito anteriormente, o que degrada, metaboliza, escinde o altera químicamente de otro modo el ligando de ácido nucleico para modificar su efecto biológico como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos de moduladores incluyen (A) oligonucleotídicos o análogos de los mismos que son complementarios a al menos una parte de la secuencia del aptámero (incluyendo ribozimas o ADNzimas o, por ejemplo, ácidos péptido nucleicos (PNA), ácidos mofolino nucleicos (MNA), o ácidos nucleicos cerrados (LNA)), y (E) quimeras, productos de fusión, u otras combinaciones de cualquiera de los anteriores.

En una realización alternativa de la invención, el propio modulador es un aptámero. En esta realización, primero se genera un ligando de ácido nucleico que se une al agente terapéutico deseado. En una segunda etapa, se genera un segundo aptámero que se une al primer aptámero usando el proceso SELEX descrito en este documento u otro proceso, y modula la interacción entre el aptámero terapéutico y la diana.

En otras realizaciones alternativas, el ligando de ácido nucleico que se une a la diana es un PNA, MNA, LNA o PCO y el modulador es un aptámero. Como alternativa, el ligando de ácido nucleico que se une a la diana es un PNA, MNA, LNA o PCO, y el modulador es un MNA. Como alternativa, el ligando de ácido nucleico que se une a la diana es un PNA, MNA, LNA o PCO, y el modulador es un LNA. Como alternativa, el ligando de ácido nucleico que se une a la diana es un PNA, MNA, LNA o PCO, y el modulador es PCO.

### Oligonucleótidos y Análogos de los Mismos

#### 1. Ácido Polinucleico

El modulador de la invención es un oligonucleótido que comprende una secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia del ligando de ácido nucleico marcado como diana. Por ejemplo, el modulador oligonucleotídico puede comprender una secuencia complementaria a 6-25 nucleótidos del ligando de ácido nucleico marcado como diana, típicamente, 8-20 nucleótidos, más típicamente, 10-15 nucleótidos. De forma ventajosa, el modulador oligonucleotídico es complementario a 6-25 nucleótidos consecutivos del ligando de ácido nucleico, u 8-20 ó 10-15 nucleótidos consecutivos. La longitud del modulador oligonucleotídico puede optimizarse fácilmente teniendo en cuenta el ligando de ácido nucleico marcado como diana y el efecto buscado. Típicamente el modulador oligonucleotídico es de 5-80 nucleótidos de longitud, más típicamente, de 10-30 y mucho más típicamente de 15-20 nucleótidos (por ejemplo, 15-17). El oligonucleótido puede prepararse con nucleótidos que albergan estequiometría D o L, o una mezcla de las mismas. Los nucleósidos de origen natural están en configuración D.

La formación de dúplex por la unión de pares complementarios de oligonucleótidos cortos es una reacción bastante rápida con constantes de velocidad de asociación de segundo orden generalmente entre  $1 \times 10^6$  y  $3 \times 10^5$   $M^{-1} s^{-1}$ . La fase inicial de la reacción de unión implica la formación de un dúplex de dos a tres pares de bases, llamada "nucleación". Después de la nucleación, el apareamiento procede a lo largo de la longitud completa de la secuencia complementaria a una velocidad muy rápida - aproximadamente  $10^6$  bases por segundo a 20°C. Por tanto, el efecto modulador sobre un ligando de ácido nucleico por la formación de un dúplex con un oligonucleótido complementario es rápido. La estabilidad de dúplex cortos es muy dependiente de la longitud y la composición de bases del dúplex. Los parámetros termodinámicos para la formación de dúplex de ácido nucleico cortos se han medido rigurosamente, produciendo las reglas del contiguo más cercano para todos los pares de bases posibles de modo que se pueden calcular predicciones precisas de la energía libre,  $T_m$  y por tanto la vida media de un dúplex oligorribonucleotídico dado (por ejemplo, Xia *et al.*, *Biochem.* 37: 14719 (1998) (véase también Eguchi *et al.* *Antigens RNA*, *Annu. Rev. Biochem.* 60: 631 (1991)).

Los moduladores oligonucleotídicos de la invención están dirigidos ventajosamente a regiones monocatenarias del ligando de ácido nucleico. Esto facilita la nucleación y, por lo tanto, la velocidad de la modulación de la actividad del ligando de ácido nucleico, y también, generalmente conduce a dúplex intermoleculares que contienen más pares de bases que el ligando de ácido nucleico marcado como diana.

Pueden usarse diversas estrategias para determinar el sitio óptimo para la unión del oligonucleótido a un ligando de ácido nucleico marcado como diana. Puede usarse una estrategia empírica en la que se "recorren" oligonucleótidos complementarios a lo largo del aptámero. Un experimento de recorrido puede implicar dos experimentos realizados secuencialmente. Puede producirse una nueva mezcla de candidatos en la que cada uno de los miembros de la mezcla de candidatos tenga una región de ácido nucleico fija que corresponda a un modulador oligonucleotídico de interés. Cada miembro de la mezcla de candidatos también contiene una región aleatorizada de secuencias. De acuerdo con este método es posible identificar lo que se conoce como ligandos de ácido nucleico "extendidos", que contienen regiones que pueden unirse a más de un dominio de unión de un ligando de ácido nucleico. De acuerdo con este enfoque, pueden usarse 2'-O-metil oligonucleótidos (por ejemplo, 2'-O-metil oligonucleótidos) de aproximadamente 15 nucleótidos de longitud que están escalonados en aproximadamente 5 nucleótidos en el aptámero (por ejemplo, oligonucleótidos complementarios a los nucleótidos 1-15, 6-20, 11-25, etc. del aptámero 9.3t). Una estrategia empírica puede ser particularmente eficaz porque el impacto de la estructura terciaria del aptámero sobre la eficacia de hibridación puede ser difícil de predecir. Pueden usarse ensayos descritos en los siguientes Ejemplos para evaluar la capacidad de los diferentes oligonucleótidos de hibridar con un ligando de ácido nucleico específico, con énfasis particular sobre el exceso molar del oligonucleótido requerido para conseguir la unión completa del ligando de ácido nucleico. La capacidad de los diferentes moduladores oligonucleotídicos de aumentar la velocidad de disociación del ligando de ácido nucleico de, o la asociación del ligando de ácido nucleico con, su molécula diana también puede determinarse realizando estudios cinéticos convencionales usando, por ejemplo, ensayos BIACORE. Los moduladores oligonucleotídicos pueden seleccionarse de modo que se requiera un exceso molar de factor 5-50 de oligonucleótido, o menos, para modificar la interacción entre el ligando de ácido nucleico y su molécula diana del modo deseado.

Como alternativa, el ligando de ácido nucleico marcado como diana puede modificarse para que incluya un tramo final monocatenario (3' ó 5') para promover la asociación con un modulador oligonucleotídico. Los tramos finales adecuados pueden comprender de 1 a 20 nucleótidos, preferiblemente, 1-10 nucleótidos, más preferiblemente, 1-5 nucleótidos y, mucho más preferiblemente, 3-5 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos modificados tales como secuencias 2'-O-metilo). Los ligandos de ácido nucleico con tramos finales pueden ensayarse en ensayos de unión y bioensayos (por ejemplo, como se describe en los siguientes Ejemplos) para verificar que la adición del tramo final monocatenario no altera la estructura activa del ligando de ácido nucleico. Puede diseñarse una serie de oligonucleótidos (por ejemplo, 2'-O-metil oligonucleótidos) que pueden formar, por ejemplo, 1, 3 ó 5 pares de bases con la secuencia del tramo final

y ensayarse para su capacidad de asociarse con el aptámero con tramo final solo, así como su capacidad de aumentar la velocidad de disociación del ligando de ácido nucleico de, o la asociación del aptámero con, su molécula diana. Pueden emplearse controles de secuencia mezclada para verificar que los efectos se deben a la formación de dúplex y no a efectos no específicos. Puede usarse el ensayo en gel nativo descrito en los siguientes Ejemplos para medir la velocidad de disociación/asociación de un modulador oligonucleotídico de/con un aptámero diana.

La presente invención proporciona moduladores que revierten de forma específica y rápida los efectos anticoagulantes y antitrombóticos de los ligandos de ácido nucleico que están dirigidos a los componentes de la vía de coagulación, particularmente ligandos de ácido nucleico antagonistas de los complejos enzimáticos de factor tisular (TF)/factor VIIa (FVIIa), factor VIIIa (FVIIIa)/factor IXa (FIXa), factor Va (FVa)/factor Xa (Fxa) y receptores plaquetarios tales como gpIIb/IIIa, gpIb/IX, gpVI, factores implicados en la promoción de la activación plaquetaria tales como Gas6, factores implicados en la promoción o mantenimiento de la formación de coágulos de fibrina tales como PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno 1) o el factor de coagulación XIIIa (FXIIIa), y factores adicionales implicados en la promoción o prevención de la formación de coágulos de fibrina tales como ATIII (anti-trombina III), trombina o el factor de coagulación XIa (FXIa). De acuerdo con esta realización, se administran moduladores (en este caso, inhibidores, ventajosamente, inhibidores oligonucleotídicos) que revierten la actividad del ligando de ácido nucleico.

En realizaciones específicas, los moduladores de la actividad del ligando de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención son ácidos nucleicos seleccionados entre el grupo compuesto por, aunque sin limitación, las siguientes secuencias; 5' AUGGGGAGGCAGCAUUA3' (SEC ID N° 25), 5' CAUGGGGAGGCAGCAUUA3' (SEC ID N° 26), 5' CAUGGGGAGGCAGCA3' (SEC ID N° 27), 5' CAUGGGGAGGCA3' (SEC ID N° 28), 5' GCAUUACGCG GUAUAGUCCCCUA3' (SEC ID N° 29), 5' CGCGGUAUAGUCCCCUA3' (SEC ID N° 30), 5' CUCGCUGGGG CUCUC3' (SEC ID N° 31), 5' UAUUAUCUCGCGGGG3' (SEC ID N° 32), 5' AAGAGCGGGGCCAAG3' (SEC ID N° 33), 5' GGGCCAAGUAUUAU3' (SEC ID N° 34), 5' CAAGAGCGGGGCCAAG3' (SEC ID N° 35), 5' CGA GUAUUAUCUUG3' (SEC ID N° 36), 5' CGCGGUAUAGUCCCCUA3' (SEC ID N° 41), o cualquier modificación o derivado de las mismas en las que se mantiene la hibridación o es opcionalmente al menos un 95% homóloga a la secuencia.

Por ejemplo, el inhibidor de un ligando de ácido nucleico para el Factor IXa de la presente invención puede ser un oligonucleótido antisentido. El oligonucleótido antisentido hibrida con el ligando de ácido nucleico *in vivo* y bloquea la unión del ligando de ácido nucleico al factor IXa.

Los moduladores oligonucleotídicos de la invención comprenden una secuencia complementaria a al menos una parte de un ligando de ácido nucleico. Sin embargo, no se requiere complementariedad absoluta. Una secuencia "complementaria a al menos una parte de un ligando de ácido nucleico", mencionada en este documento, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para ser capaz de hibridar con el ligando de ácido nucleico. La capacidad de hibridar puede depender tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más grande es el oligonucleótido de hibridación, más desapareamiento de bases con un ligando de ácido nucleico diana puede contener y aún formar un dúplex estable (o triple hélice como puede ser el caso). Un especialista en la técnica puede establecer un grado tolerable de desapareamiento por el uso de procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado. En aspectos específicos, el oligonucleótido puede ser de al menos 5 o al menos 10 nucleótidos, al menos 15 ó 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios.

Se analizan técnicas antisentido, por ejemplo, en Okano, J., *Neurochein.* 56: 560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). Los métodos se basan en la unión de un polinucleótido a un ADN o ARN complementario.

Los oligonucleótidos de la invención pueden modificarse en el resto de base, el resto de azúcar, o la estructura fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos. Para este fin, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, agente de reticulación activado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión activado por hibridación, etc. El oligonucleótido puede comprender al menos un resto de base modificado que se selecciona entre el grupo que incluye, aunque sin limitación, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2 $\alpha$ -tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metilto-N6-isopenteniladenina, ácido uracil oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil oxiacético (v), 5-metil tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-carboxipropilo) y 2,6-diaminopurina.

Un modulador oligonucleotídico de la invención también puede comprender al menos un resto de azúcar modificado seleccionado entre el grupo que incluye, aunque sin limitación, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilosa, y hexosa.

En otra realización más, un modulador oligonucleotídico puede comprender al menos una estructura fosfato modificada seleccionada entre el grupo que incluye, aunque sin limitación, un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosforodiamidato, un metilfosfonato, un alquil fosfotriéster, y un formacetal o análogo de los mismos.

5 Pueden prepararse moduladores oligonucleotídicos que tienen características deseadas, tales como estabilidad mejorada *in vivo* y/o características de suministro mejoradas. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones del azúcar y/o la estructura y/o la base. Los moduladores oligonucleotídicos pueden contener derivados de nucleótidos modificados en las posiciones 5 y 2' de pirimidinas, por ejemplo, los nucleótidos pueden modificarse con 2'-amino, 2'-fluoro y/o 2'-O-metilo. Las modificaciones de los oligonucleótidos de modulación de la invención pueden incluir aquellas que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga, polarización, hidrofobicidad, formación de enlaces de hidrógeno y/o interacción electrostática adicional. Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitación, modificaciones del azúcar en la posición 2', ácidos nucleicos cerrados, modificaciones de pirimidina en la posición 5, modificaciones de purina en la posición 8, modificación en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo, modificaciones en la estructura, modificaciones de fosforotioato o alquilfosfato, metilaciones, combinaciones de pares de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina, etc. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5', tales como recubrimiento. (Véase también Manoharan, *Biochem. Biophys. Acta* 1489: 117 (1999); Herdewija, *Antisense Nucleic Acid Drug Development* 10: 297 (2000); Maier *et al.*, *Organic Letters* 2: 1819 (2000)).

20 Los oligonucleótidos de la invención pueden sintetizarse por métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo por el uso de un sintetizador de ADN automático (tal como los que están disponibles en el mercado en Biosearch, Applied Biosystems, etc.).

25 Usando las instrucciones proporcionadas en este documento, un especialista en la técnica puede poner en práctica fácilmente la invención para regular cualquier ácido nucleico terapéutico por la administración oportuna de un ácido nucleico complementario que interrumpa o modifique de otro modo la actividad del ligando terapéutico. Esta técnica puede usarse, por ejemplo, con respecto a cualquiera de los ligandos de ácido nucleico descritos o mencionados en los documentos de patente citados anteriormente.

30

## 2. Ribozimas y ADNzimas

35 Asimismo, usando las instrucciones proporcionadas en este documento, un especialista en la técnica puede poner en práctica fácilmente la invención para regular cualquier ligando de ácido nucleico terapéutico por la administración oportuna de una ribozima o una ADNzima.

Los ácidos nucleicos enzimáticos actúan uniéndose primero a un ARN diana (o ADN, véase la Patente de Estados Unidos de Cech Nº 5.180.818). Dicha unión sucede a través de la parte de la unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en cercana proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa escindiendo el ARN diana. Por tanto, el ácido nucleico enzimático primero reconoce y después se une a un ARN diana a través de apareamiento de bases complementarias, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente cortando el ARN diana. La escisión de dicho ARN diana destruirá su capacidad de dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático se haya unido y haya escindido su diana de ARN se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas permitiendo de este modo la inactivación de aptámeros de ARN. Hay al menos cinco clases de ribozimas que presentan cada una un tipo diferente de especificidad. Por ejemplo, los Intrones del Grupo I son de ~300 a >1000 nucleótidos de tamaño y requieren un U en la secuencia diana inmediatamente 5' del sitio de escisión y se une a 4-6 nucleótidos en el lado 5' del sitio de escisión. Hay más de 75 miembros conocidos de esta clase, se encuentran en el ARNr de *Tetrahymena thermophila*, mitocondrias fúngicas, cloroplastos, el fago T4, algas azul-verdosas, y otras.

Otra clase son ARN RNasaP (ARN M1), que son de ~290 a 400 nucleótidos de tamaño. Son la parte de ARN de una enzima ribonucleoproteica y escinden precursores de ARNt para formar el ARNt maduro. Hay casi 10 miembros conocidos de este grupo y todos son de origen bacteriano. Un tercer ejemplo son las ribozimas en cabeza de martillo, que son de ~30 a 40 nucleótidos de tamaño. Requieren la secuencia diana UH inmediatamente 5' del sitio de escisión y se unen a nucleótidos de número variable en ambos lados del sitio de escisión. Hay al menos 14 miembros conocidos de esta clase que se encuentran en varios patógenos vegetales (virusoides) que usan ARN como agente infeccioso. Una cuarta clase son las ribozimas de horquilla, que son de ~50 nucleótidos de tamaño. Requieren la secuencia diana GUC inmediatamente 3' del sitio de escisión y se unen a 4 nucleótidos en el lado 5' del sitio de escisión y una cantidad variable en el lado 3' del sitio de escisión. Se encuentran en un patógeno vegetal (ARN satélite del virus de la mancha anular del tabaco) que usa ARN como agente infeccioso. El quinto grupo son ribozimas del Virus de la Hepatitis Delta (HDV), que son de ~60 nucleótidos de tamaño.

65 La naturaleza enzimática de una ribozima puede ser ventajosa sobre otras tecnologías, tales como la tecnología antisentido, en ciertas aplicaciones ya que la concentración eficaz de ribozima necesaria para realizar un tratamiento terapéutico puede ser menor que la de un oligonucleótido antisentido. Esta ventaja refleja la capacidad de la ribozima de actuar enzimáticamente. Por tanto, una única molécula de ribozima es capaz de escindir muchas moléculas de aptámeros de ARN diana. Además, la ribozima es un inhibidor altamente específico, dependiendo la especificidad de

inhibición no solamente del mecanismo de unión de apareamiento de bases, sino también del mecanismo por el que la molécula inhibe la expresión del ARN al que se une. Es decir, la inhibición está causada por la escisión de la diana de ARN y por tanto la especificidad está definida como la proporción de la velocidad de escisión del ARN marcado como diana sobre la velocidad de escisión de ARN no marcado como diana. Este mecanismo de escisión depende de factores adicionales a los implicados en el apareamiento de bases. Por tanto, la especificidad de la acción de una ribozima, en ciertas circunstancias, puede ser mayor que la de un oligonucleótido antisentido que se une al mismo sitio de ARN.

Otra clase de moléculas catalíticas se llaman "ADNzimas". Las ADNzimas son monocatenarias, y escinden tanto ARN como ADN. Se ha propuesto un modelo general para la ADNzima, y se conoce como el modelo "10-23". Las ADNzimas que siguen el modelo "10-23", también mencionadas simplemente como "ADNzimas 10-23", tienen un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos, flanqueado por dos dominios de reconocimiento de sustrato de siete a nueve desoxirribonucleótidos cada uno. Análisis *in vitro* muestran que este tipo de ADNzima puede escindir de forma eficaz su ARN sustrato en uniones de purina:pirimidina en condiciones fisiológicas. Como se usa en este documento, "ADNzima" significa una molécula de ADN que reconoce específicamente y escinde una secuencia de ácido nucleico diana distinta, que puede ser ADN o ARN.

Las ribozimas y las ADNzimas comprenden tanto dominios de unión a sustrato como dominios catalíticos. Las normas para el diseño óptimo de las ribozimas reguladoras pueden encontrarse en *Methods in Molecular Biology Volumen 74 "Ribozyme Protocols"* editado por Philip C. Turner (Humana Press, Totowa, NJ, 1997). También se describen estrategias para identificar sitios reactivos para ribozimas dentro de un ácido nucleico marcado como diana en este volumen. Usando estas normas convencionales, pueden diseñarse específicamente ribozimas en cabeza de martillo, ribozimas de horquilla, ribozimas del virus de la hepatitis delta y ribozimas derivadas de los intrones del grupo I para que se unan a y escindan un ligando de ácido nucleico diana. La capacidad de dichas ribozimas o ADNzimas de escindir el ligando de ácido nucleico diana puede determinarse en cualquiera de varios ensayos. Por ejemplo, después de incubación de una ribozima o ADNzima con un ligando de ácido nucleico diana no marcado o marcado (por ejemplo, <sup>32</sup>P) en condiciones que favorezcan la reacción, puede analizarse el ácido nucleico diana por electroforesis en gel desnaturalizante para determinar si la ribozima o ADNzima escinde la estructura del ligando de ácido nucleico diana. Como alternativa, puede usarse la transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia, o el cambio en la intensidad de fluorescencia para medir la escisión de un ligando de ácido nucleico apropiadamente marcado.

### 3. Análogos de Ácido Polinucleico (Ácidos Péptido Nucleicos (PNA), Ácidos Morfolino Nucleicos (MNA), Ácidos Nucleicos Cerrados (LNA)), y Oligonucleótidos Pseudo-Cíclicos (PCO)

Las nucleobases de los moduladores oligonucleotídicos de la invención pueden conectarse mediante enlaces entre nucleobases, por ejemplo, enlaces peptídico (como en el caso de ácidos péptido nucleicos (PNA); Nielsen *et al.* (1991) *Science* 254, 1497 y la Patente de Estados Unidos N° 5.539.082) y enlaces morfolino (Qin *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10, 11 (2000); Summerton, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 187 (1997); Summerton *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 63 (1997); Taylor *et al.*, *J Biol Chem.* 271, 17445 (1996); Partridge *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6, 169 (1996)), o por cualquier otro enlace natural o modificado. Las oligonucleobases también pueden ser ácidos nucleicos cerrados (LNA). Nielsen *et al.*, *J Biomol Struct Dyn* 17, 175 (1999); Petersen *et al.*, *J Mol Recognit* 13, 44 (2000); Nielsen *et al.*, *Bioconjug Chem* 11, 228 (2000).

Los PNA son compuestos que son análogos a los oligonucleótidos, pero difieren en la composición. En los PNA, la estructura de desoxirribosa del oligonucleótido se reemplaza con una estructura peptídica. Cada subunidad de la estructura peptídica está unida a una nucleobase de origen natural o de origen no natural. El PNA a menudo tiene una estructura de poliamida aciral que consta de unidades de N-(2-aminoetil)glicina. Las bases de purina o pirimidina están unidas a cada unidad mediante un enlazador de metilencarbonilo (1-3) para dirigir el ácido nucleico complementario. El PNA se une a ARN o ADN complementario en una orientación paralela o antiparalela siguiendo las normas de apareamiento de bases de Watson y Crick. La naturaleza no cargada de los oligómeros de PNA potencia la estabilidad de los dúplex híbridos PNA/ADN(ARN) en comparación con los homodúplex naturales. El carácter no natural del PNA hace a los oligómeros de PNA altamente resistentes a ataques por proteasas y nucleasas. Estas propiedades de los oligómeros de PNA les permiten servir como moléculas antisentido o moduladores eficaces de la actividad del ligando de ácido nucleico. De hecho, los ácidos péptido nucleicos se han aplicado para bloquear la expresión de proteínas a nivel transcripcional y traduccional, y oligómeros de PNA microinyectados demuestran un fuerte efecto antisentido en células intactas. Véase [www.bioscience.org/1999/v4/d/soomets/fulltext.htm](http://www.bioscience.org/1999/v4/d/soomets/fulltext.htm); y *Frontiers in Bioscience*, 4, d782-786 (1 de noviembre de 1999) para detalles sobre éxitos recientes sobre la aplicación de PNA antisentido, especialmente los relacionados con el suministro a células o tejido completo del PNA. Véase también Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H. y Buchardt, O. (1993) *Peptide nucleic acids (PNA). DNA analogues with a polyamide backbone*. En "*Antisense Research and Application*" Crook, S. & Lebleu, B. (eds.) CRC Press, Boca Raton, pág. 363-373.

Los PNA se unen tanto a ADN como a ARN y forman dúplex de PNA/ADN o PNA/ARN. Los dúplex resultantes de PNA/ADN o PNA/ARN se unen de forma más fuerte que los dúplex correspondientes de ADN/ADN o ADN/ARN como se evidencia por sus temperaturas de fusión ( $T_m$ ) más elevadas. Esta elevada estabilidad térmica de los dúplex de PNA/ADN(ARN) se ha atribuido a la neutralidad de la estructura del PNA, que provoca la eliminación de la repulsión de cargas que está presente en dúplex de ADN/ADN o ARN/ARN. Otra ventaja de los dúplex de PNA/ADN(ARN)

es que la  $T_m$  es prácticamente independiente de la concentración salina. Los dúplex de ADN/ADN, por otro lado, son altamente dependientes de la fuerza iónica.

Como los PNA son análogos de ADN en los que la estructura es un pseudopéptido en lugar de un azúcar, imitan el comportamiento del ADN y se unen a cadenas de ácido nucleico complementarias. También pueden incorporarse nucleobases no naturales, tales como pseudoisocitosina, 5-metilcitosina y 2,6-diaminopurina, entre muchos otros, en sintones de PNA. Los PNA se sintetizan más habitualmente a partir de monómeros (sintones de PNA) protegidos de acuerdo con la estrategia de protección con t-Boc/bencilo, en la que el grupo amino de la estructura del polímero creciente se protege con el grupo t-butiloxicarbonilo (t-Boc) y los grupos amino exocíclicos de las nucleobases, si están presentes, se protegen con el grupo benciloxicarbonilo (bencilo). Los sintones de PNA protegidos usando la estrategia de t-Boc/bencilo ahora están disponibles en el mercado.

El PNA es estable tanto biológica como químicamente y está fácilmente disponible por síntesis automática ((Hy-rup, B., Egholm, M., Rolland, M., Nielsen, P. E., Berg, R. H. & Buchardt, O. (1993) Modification of the binding affinity of peptide nucleic acids (PNA). PNA with extended backbones consisting of 2-Aminoethyl-Alanine or 3-Aminopropylglycine units. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 518-519); Demidov, V., Frank-Kamenetskii, M.D., Egholm, M., Buchardt, O. y Nielsen, P.E. (1993). Sequence selective double strand DNA cleavage by PNA targeting using nuclease S1. *Nucleic Acids Res.* 21, 2103-2107). Estas propiedades han hecho del PNA un muy buen ejemplo para fármacos de terapia génica antisentido, y estudios *in vitro* han sostenido adicionalmente el potencial antisentido (Nielsen, P.E. "Peptide Nucleic Acid (PNA) A model structure for the primordial genetic material" *Origins of Life* 1993, 23, 323-327; Egholm, M., Behrens, C., Christensen, L., Berg, R.H., Nielsen, P.E. y Buchardt, O. "Peptide nucleic acids containing adenine or guanine recognize thymine and cytosine in complementary DNA sequences" *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1993, 800-801; Kim, S.K., Nielsen, P.E., Egholm, M., Buchardt, O., Berg, R.H. y Norden, B. "Right-handed triplex formed between peptide nucleic acid PNA-T<sub>8</sub> and poly(dA) shown by linear and circular dichroism spectroscopy" *J. Amer. Chem. Soc.* 1993, 115, 6477-6481; Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S.M., Driver, D.A., Berg, R.H., Kim, S.K., Norden, B. y Nielsen, P.E. "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding rules" *Nature* 1993, 365, 556-568; Buchardt, O., Egholm, M., Berg, R. y Nielsen, P.E. "Peptide Nucleic Acids (PNA) and their potential applications in medicine and biotechnology" *Trends Biotechnology*, 1993, 11, 384-386).

Parece que los PNA son muy útiles para varias aplicaciones especiales. Cuando están dirigidos contra secuencias todas de purina raras, los PNA pueden bloquear la traducción en cualquier parte en un ARNm formando una estructura de doble pinza. Con dichas secuencias de ARN raras un segmento del PNA se une a la secuencia diana por uniones de Watson y Crick y el otro segmento del PNA se une a los sitios de surco mayor del dúplex resultante de PNA/ARN. Probablemente a causa de su estructura central muy flexible, los PNA también forman fácilmente estructuras de triple hélice con secuencias raras de ADN dúplex que comprenden principalmente purinas en una cadena y principalmente pirimidinas en la otra cadena. Finalmente, en condiciones de baja salinidad en sistemas libres de células los PNA han demostrado conseguir una invasión específica de secuencia de secuencias de ADN dúplex, provocando la inhibición de la transcripción del dúplex invadido.

Recientes estudios por varios grupos han demostrado que el acoplamiento del PNA con diferentes vehículos puede mejorar su captación en células. Entre estos, "los péptidos de captación celular", los ácidos grasos o el ADN, especialmente varias secuencias peptídicas han demostrado ser capaces de transportar oligómeros de PNA a través de las membranas celulares. Los conjugados de péptido vector-PNA han demostrado cruzar la membrana de las neuronas y suprimir el ARNm marcado como diana (Aldrian-Herrada, G. *et al.* (1998) *Nucleic Acid Res.* 26: 4920). Se ha informado de que un PNA biotinilado unido a un conjugado de esteptavidina y el anticuerpo monoclonal murino OX26 contra el receptor de la transferrina de rata cruza la barrera hematocéfálica de ratas *in vivo* (Pardridge, W. *et al.* 1995 *PNAS* 92: 5592-5596). Chinnery, P. F. *et al.* unieron el péptido presecuencia de la subunidad VIII de la citocromo c oxidasa (COX) humana codificada en el núcleo a PNA biotinilado que se había importado de forma exitosa en mitocondrias aisladas *in vitro* (Chinnery, P. F. *et al.* 1999 *Gene Ther.* 6: 1919-28). El suministro del péptido-PNA biotinilado a mitocondrias en células intactas se confirmó por microscopía confocal. Además, un corto péptido hidrófobo con la secuencia biotín-FLFL acoplada a un trímero de PNA ha demostrado internalizarse en eritrocitos humanos y células Namalwa (Scarfì, S., A. Gasparini, G. Damonte y U. Benatti: Synthesis, uptake, and intracellular metabolism of a hydrophobic tetrapeptide-peptide nucleic acid (PNA)-biotin molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 236, 323-326). Basu y Wickström (Synthesis and characterization of a peptide nucleic acid conjugated to a D-peptide analog of insulin-like growth factor 1 for increased cellular uptake. *Bioconjugate Chem* 1997, 8, 481-488) mostraron que un PNA conjugado con un péptido que imita al factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) todo de D-aminoácidos se captaba específicamente por células que expresan el receptor de IGF1, aunque no se describió actividad antisentido.

Para algunos ejemplos de otros trabajos, véase Nielsen, P. E., M. Egholm, R. H. Berg y O. Buchardt: Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254, 1497-1500 (1991); Egholm, M., O. Buchardt, P. E. Nielsen y R. H. Berg: Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone. *J Am Chem Soc* 114, 1895-1897 (1992); Nielsen, P. E., M. Egholm y O. Buchardt: Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjugate Chemistry* 5, 3-7 (1994); Egholm, M., P. E. Nielsen, O. Buchardt y R. H. Berg: Recognition of guanine and adenine in DNA by cytosine and thymine containing peptide nucleic acid. *J Am Chem Soc* 114, 9677-9678 (1992); Egholm, M., O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden y P. E. Nielsen: PNA hybridizes to com-

plementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules [véanse los comentarios]. *Nature* 365, 566-568 (1993); Wittung, P., P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm y B. Nordén: DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid. *Nature* 368, 561-563 (1994); Brown, S. C., S. A. Thomson, J. M. Veal y D. G. Davis: NMR solution structure of a peptide nucleic acid complexed with RNA. *Science* 265, 777-780 (1994); Demidov, V. V., V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen y P. E. Nielsen: Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochemical Pharmacology* 48, 1310-1313 (1994); Peffer, N. J., J. C. Hanvey, J. E. Bisi, S. A. Thomson, C. F. Hassman, S. A. Noble y L. E. Babiss: Strand-invasion of duplex DNA by peptide nucleic acid oligomers. *Proc Nat Acad Sci USA* 90, 10648-10652 (1993).

10 La Patente de Estados Unidos N° 6.046.307 de Shay *et al.* describe PNA que inhiben la actividad telomerasa en células de mamífero. La Patente de Estados Unidos N° 5.789.573 de Baker *et al.* describe composiciones y métodos para inhibir la traducción de ARNm marcados como diana recubiertos usando PNA. La Patente de Estados Unidos N° 6.165.720 describe el marcaje del complejo de PNA.

15 Se puede preparar fácilmente un PNA o MNA que sea complementario al menos en parte a un ligando de ácido nucleico usando las mismas normas de complementariedad y el apareamiento de bases de Watson y Crick que se usan en la preparación de moléculas antisentido oligonucleotídicas convencionales.

20 Los ácidos morfolino nucleicos se llaman así porque se ensamblan a partir de subunidades de morfolino, cada una de las cuales contiene una de las cuatro bases genéticas (adenina, citosina, guanina, y timina) unida a un anillo morfolina de 6 miembros. Se unen de dieciocho a veinticinco subunidades de estos cuatro tipos de subunidades en un orden específico por enlaces fosforodiamidato no iónicos entre subunidades para dar un oligo morfolino. Estos oligos morfolino, con sus restos estructurales de morfolina de 6 miembros unidos por enlaces no iónicos, producen propiedades antisentido sustancialmente mejores que el ARN, el ADN, y sus análogos que tienen restos estructurales de ribosa o desoxirribosa de 5 miembros unidos por enlaces iónicos (véase [www.genetools.com/Morpholinos/body\\_morpholinos.HTML](http://www.genetools.com/Morpholinos/body_morpholinos.HTML)).

30 Los morfolinos, ideados por Summerton en 1985, constituyen un rediseño radical de ácidos nucleicos naturales, con las ventajas potenciales de materiales de partida de bajo coste y ensamblaje económico. Como los PNA, los morfolinos son completamente resistentes a las nucleasas y parece que están libres de la mayoría o de todos los efectos no antisentido que se observan con S-ADN. En contraste con PNA, la mayoría de los morfolinos muestran excelente solubilidad acuosa. Los morfolinos también tienen afinidades de unión a ARN mucho mayores que los S-ADN, aunque no tan elevadas como los PNA. Probablemente como resultado de sus afinidades de unión a ARN sustanciales, los morfolinos largos (de 25 unidades) proporcionan direccionamiento predecible y eficacia muy elevada. 35 Los morfolinos más notables proporcionan buena especificidad de secuencia. Los mismos factores subyacentes a su excepcional especificidad de secuencia también los vuelven inadecuados para dirigirse a mutaciones puntuales.

40 La Patente de Estados Unidos N° 6.153.737 de Manoharan *et al.* se refiere a oligonucleótidos derivatizados en los que los nucleósidos unidos están funcionalizados con péptidos, proteínas, vitaminas hidrosolubles o vitaminas liposolubles. Esta descripción estaba dirigida a agentes terapéuticos antisentido por modificación de oligonucleótidos con una secuencia peptídica o proteica que ayuda a la entrada selectiva del complejo en la envuelta nuclear. Asimismo, pueden usarse vitaminas hidrosolubles y liposolubles para ayudar en la transferencia del agente terapéutico antisentido o agente de diagnóstico a través de las membranas celulares.

45 La unión eficaz y específica de secuencia a ARN o ADN combinada con la estabilidad biológica muy elevada hace de los PNA y MNA ejemplos extremadamente atractivos para el desarrollo de moduladores de la presente invención. Se distinguen ácidos péptido nucleicos que pueden conjugarse con los vehículos en la Patente de Estados Unidos N° 5.864.010 titulada Peptide Nucleic Acid Combinatorial Libraries and Improved Methods of Synthesis, desarrollada por ISIS Pharmaceuticals, que se incorpora por la presente como referencia. Además, se distinguen ácidos péptido nucleicos que pueden conjugarse con los vehículos de la presente invención en la Patente de Estados Unidos N° 5.986.053 titulada Peptide nucleic acids complexes of two peptide nucleic acid strands and one nucleic acid strand.

55 El LNA es una nueva clase de análogos de ADN que tiene algunas características que lo hacen un candidato excelente para moduladores de la invención. Los monómeros de LNA son compuestos bicíclicos estructuralmente similares a monómeros de ARN. El LNA comparte la mayoría de las propiedades químicas del ADN y ARN, es soluble en agua, puede separarse por electroforesis en gel, precipitarse en etanol etc. (Tetrahedron, 54, 3607-3630 (1998)). Sin embargo, la introducción de monómeros de LNA en oligos de ADN o ARN provoca una estabilidad térmica elevada de los dúplex con ADN o ARN complementario, mientras que, al mismo tiempo, se cumplen las normas de apareamiento de bases de Watson y Crick. Esta elevada estabilidad térmica de los dúplex formados con oligómeros de LNA junto con el hallazgo de que cebadores que contienen LNA localizados 3' son sustratos para extensiones enzimáticas, por ejemplo la reacción de PCR, se usa en la presente invención para aumentar significativamente la especificidad de la detección de ácidos nucleicos variantes en los ensayos *in vitro* descritos en la solicitud. Los procesos de amplificación de alelos individuales sucede de forma altamente discriminatoria (no son visibles reacciones cruzadas) y pueden tener lugar varias reacciones en el mismo recipiente. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.316.198.

También pueden usarse oligonucleobases pseudocíclicas (PCO) como modulador en la presente invención (véase la Patente de Estados Unidos N° 6.383.752). Las PCO contienen dos segmentos oligonucleotídicos unidos a través de sus extremos 3'-3' ó 5'-5'. Uno de los segmentos (el "segmento funcional") de la PCO tiene alguna funcionalidad (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido complementario a un ARNm diana). Otro segmento (el "segmento protector") es complementario al extremo 3' ó 5'-terminal del segmento funcional (dependiendo del extremo a través del cual está unido al segmento funcional). Como resultado de la complementariedad entre los segmentos funcional y protector, las PCO forman estructuras pseudocíclicas intramoleculares en ausencia de los ácidos nucleicos diana (por ejemplo, ARN). Las PCO son más estables que los oligonucleótidos antisentido convencionales a causa de la presencia de enlaces 3'-3' ó 5'-5' y la formación de estructuras pseudocíclicas intramoleculares. Estudios de farmacocinética, distribución tisular, y estabilidad en ratones sugieren que las PCO tienen mayor estabilidad *in vivo* que y, perfiles farmacocinético y de distribución tisular similares a, los de oligonucleótidos PS en general, pero se eliminan rápidamente de tejidos seleccionados. Cuando se unen apropiadamente un fluoróforo y moléculas inactivadoras a las PCO de la presente invención, la molécula emitirá fluorescencia cuando esté en configuración lineal, pero la fluorescencia se inactiva en conformación cíclica.

15

#### E. *Quimeras, Productos de Fusión y Materiales Unidos de Otro Modo*

Los oligonucleótidos o análogos de los mismos (incluyendo ribozimas o ADNzimas o ácidos péptido nucleicos (PNA) o ácidos mofolino nucleicos (MNA)), pueden combinarse covalentemente o no covalentemente para proporcionar un regulador de combinación según se desee. En un ejemplo, puede unirse un oligonucleótido, PNA o MNA a un péptido o proteína para proporcionar propiedades o un efecto terapéutico deseados. Como alternativa, puede unirse un oligonucleótido o análogo del mismo a una molécula pequeña para potenciar sus propiedades. Estos materiales pueden unirse directamente o unirse mediante un grupo espaciador como saben bien los especialistas en la técnica. En una realización, la molécula pequeña incluye un radioligando u otro agente detectable que puede controlarse usando técnicas convencionales. De este modo, puede controlarse el progreso y localización del regulador. Como alternativa, la molécula pequeña es un agente terapéutico que el regulador lleva hasta el sitio de terapia, y después se escinde opcionalmente para proporcionar su efecto terapéutico en la localización apropiada. En una tercera realización, la molécula pequeña es un quelador que une dos materiales biológicos juntos para producir un efecto combinado.

20

Las quimeras, productos de fusión o reguladores multicompuestos de otro modo pueden identificarse y evaluarse para la eficacia terapéutica como se describe a continuación con detalle.

#### III. *Identificación y Selección del Modulador*

Pueden usarse ensayos de unión convencionales para identificar y seleccionar moduladores de la invención. Ejemplos no limitantes son ensayos de desplazamiento en gel y ensayos BIACORE. Es decir, los moduladores de ensayo pueden ponerse en contacto con los ligandos de ácido nucleico a marcar como diana en condiciones de ensayo o condiciones fisiológicas típicas y se hace una determinación en cuanto a si el modulador de ensayo de hecho se une al ligando de ácido nucleico. Los moduladores de ensayo que se halla que se unen al ligando de ácido nucleico después pueden analizarse en un bioensayo apropiado (que variará dependiendo del aptámero y su molécula diana, por ejemplo, ensayos de coagulación) para determinar si el modulador de ensayo puede afectar al efecto biológico causado por el ligando de ácido nucleico sobre su molécula diana.

25

El ensayo de desplazamiento en gel es una técnica usada para evaluar la capacidad de unión. Por ejemplo, un fragmento de ADN que contiene la secuencia de ensayo se incuba primero con la proteína de ensayo o una mezcla que contiene proteínas de unión putativas, y después se separa en un gel por electroforesis. Si el fragmento de ADN se une por la proteína, será de tamaño mayor y su migración por lo tanto se retardará con relación a la del fragmento libre. Por ejemplo, un método para un ensayo de desplazamiento de movilidad en gel electroforético puede ser (a) poner en contacto en una mezcla una proteína de unión a ácido nucleico con una molécula de ácido nucleico marcada de forma no radiactiva o radiactiva que comprende una sonda molecular en condiciones adecuadas para promover interacciones de unión específica entre la proteína y la sonda para formar un complejo, donde dicha sonda se selecciona entre el grupo compuesto por ADNds, ADNss, y ARN; (b) someter a electroforesis la mezcla; (c) transferir, usando transferencia de manchas por presión positiva o transferencia capilar, el complejo a una membrana, donde la membrana es nylon cargado positivamente; y (d) detectar el complejo unido a la membrana detectando el marcador no radiactivo o radiactivo en el complejo.

30

La tecnología Biacore mide acontecimientos de unión en la superficie de un chip detector, de modo que el elemento de interacción unido a la superficie determina la especificidad del análisis. El ensayo de la especificidad de una interacción implica simplemente analizar si diferentes moléculas pueden unirse al elemento de interacción inmovilizado. La unión da un cambio intermedio en la señal de resonancia de plasmón superficial (SPR), de modo que es directamente evidente si una interacción tiene lugar o no. Los biodetectores basados en SPR controlan las interacciones midiendo la concentración de masa de biomoléculas cercanas a una superficie. La superficie se hace específica uniendo uno de los compañeros de interacción. La muestra que contiene el otro u otros compañeros fluye sobre la superficie: cuando las moléculas de la muestra se unen al elemento de interacción unido a la superficie, la concentración local cambia y se mide una respuesta de SPR. La respuesta es directamente proporcional a la masa de moléculas que se unen a la superficie.

35

La SPR surge cuando se refleja luz en ciertas condiciones desde una película conductora en la superficie de contacto entre dos medios de diferente índice de refracción. En la tecnología Biacore, los medios son la muestra y el vidrio del chip detector, y la película conductora es una fina capa de oro sobre la superficie del chip. La SPR causa una reducción en la intensidad de la luz reflejada a un ángulo específico de reflexión. Este ángulo varía con el índice de refracción cercano a la superficie en el lado opuesto de la luz reflejada. Cuando las moléculas de la muestra se unen a la superficie del detector, la concentración y por lo tanto el índice de refracción en la superficie cambian y se detecta una respuesta de SPR. La representación de la respuesta frente al tiempo durante el transcurso de una interacción proporciona una medida cuantitativa del progreso de la interacción. La tecnología Biacore mide el ángulo mínimo de intensidad de luz reflejada. La luz no se absorbe por la muestra: en su lugar la energía de la luz se disipa a través de la SPR en la película de oro. Los valores de respuesta de SPR se expresan en unidades de resonancia (UR). Una UR representa un cambio de 0,0001° en el ángulo de la intensidad mínimo. Para la mayoría de las proteínas, esto es casi equivalente a un cambio en la concentración de aproximadamente 1 pg/mm<sup>2</sup> sobre la superficie del detector. El factor de conversión exacto entre UR y concentración superficial depende de las propiedades de la superficie del detector y la naturaleza de la molécula responsable del cambio de concentración.

Hay varios ensayos diferentes que pueden determinar si un oligonucleótido o análogo del mismo puede unirse al ligando de ácido nucleico de un modo tal que la interacción con la diana se modifique. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA), calorimetría de titulación, ensayos de proximidad de centelleo, ensayos de equilibrio de sedimentación usando ultracentrifugación analítica (véase por ejemplo [www.cores.utah.edu/interaction](http://www.cores.utah.edu/interaction)), ensayos de polarización de fluorescencia, ensayos de anisotropía de fluorescencia, ensayos de intensidad de fluorescencia, ensayos de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), ensayos de unión en filtros de nitrocelulosa, ELISA, ELONA (véase, por ejemplo, el documento USP 5.789.163), RIA, o ensayos de diálisis en equilibrio para evaluar la capacidad de un agente de unirse a un ligando de ácido nucleico. Pueden realizarse ensayos directos en los que se determina directamente la interacción entre el agente y el ligando de ácido nucleico, o pueden realizarse ensayos de competición o desplazamiento en los que se determina la capacidad del agente de desplazar el ligando de ácido nucleico de su diana (por ejemplo, véase Green, Bell y Janjic, *Biotechniques* 30(5), 2001, pág. 1094 y el documento USP 6.306.598). Una vez identificado un agente modulador candidato, puede confirmarse su capacidad de modular la actividad de un ligando de ácido nucleico por su diana en un bioensayo. Como alternativa, si se identifica un agente que puede modular la interacción de un ligando de ácido nucleico con su diana, pueden usarse dichos ensayos de unión para verificar que el agente está interactuando directamente con el ligando de ácido nucleico y se puede medir la afinidad de dicha interacción.

En otra realización, puede usarse espectrometría de masas para la identificación de un regulador que se una a un ligando de ácido nucleico, el sitio o sitios de interacción entre el regulador y el ligando de ácido nucleico, y la afinidad de unión relativa de los agentes por el ligando de ácido nucleico (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.329.146, Crooke *et al.*). Dichos métodos de espectrometría de masas también pueden usarse para explorar mezclas químicas o bibliotecas, especialmente bibliotecas combinatorias, para compuestos individuales que se unan a un ligando de ácido nucleico diana seleccionado que puedan usarse como moduladores del ligando de ácido nucleico. Además, las técnicas de espectrometría de masas pueden usarse para explorar múltiples ligandos de ácido nucleico diana simultáneamente frente a, por ejemplo, una biblioteca combinatoria de compuestos. Además, las técnicas de espectrometría de masas pueden usarse para identificar la interacción entre una pluralidad de especies moleculares, especialmente moléculas “pequeñas” y un sitio de interacción molecular en un ligando de ácido nucleico diana.

Los ensayos *in vivo* o *in vitro* que evalúan la eficacia de un regulador para modificar la interacción entre un ligando de ácido nucleico y una diana son específicos para el trastorno que se está tratando. Hay abundantes ensayos convencionales para las propiedades biológicas que son bien conocidos y pueden usarse. Se proporcionan ejemplos de ensayos biológicos en las patentes citadas en esta solicitud que describen ciertos ligandos de ácido nucleico para aplicaciones específicas.

Como ejemplo no limitante, pueden realizarse ensayos de coagulación como bioensayos en laboratorios clínicos. Estos ensayos generalmente son ensayos de criterios de valoración funcionales, en los que se incubaba una muestra del paciente (plasma o sangre completa) con reactivos exógenos que activan la cascada de coagulación, y se mide el tiempo hasta la formación de coágulos. Después se compara el tiempo de coagulación de la muestra del paciente con el tiempo de coagulación de plasma o sangre completa normal combinada para proporcionar una medición patrón del estado hemostático del paciente. Como se describe a continuación, dichos ensayos de coagulación se usan habitualmente como ensayos de exploración que evalúan el funcionamiento de los sistemas de coagulación tanto intrínseco como extrínseco del paciente.

El Ensayo de Tiempo de Coagulación Activada (ACT) es un ensayo de exploración que se parece al ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), pero se realiza usando muestras de sangre completa recientes. El ACT puede usarse para controlar el estado de coagulación de un paciente en relación con procedimientos clínicos, tales como los que implican la administración de elevadas dosis de heparina (por ejemplo, CPB y PTCA).

El Ensayo de Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) es un ensayo de laboratorio central común. El APTT se usa para evaluar la vía de coagulación intrínseca, que incluye los factores I, II, V, VIII, IX, X, XI, y XII. El ensayo se realiza usando una muestra de plasma, en la que se activa la vía intrínseca por la adición de fosfolípido, un activador (ácido elálgico, caolín, o sílice micronizada), y Ca<sup>2+</sup>. La formación de los complejos de Xasa y protrombina sobre la superficie del fosfolípido posibilita que la protrombina se convierta en trombina, con la formación posterior de

## ES 2 351 784 T3

coágulos. El resultado del ensayo de APTT es el tiempo (en segundos) requerido para esta reacción. El APTT puede usarse para evaluar la competencia global del sistema de coagulación de un paciente, como un ensayo de exploración preoperatorio para tendencias de hemorragia, y como ensayo rutinario para controlar terapias con heparina. Otro ejemplo del APTT se realiza del siguiente modo. Primero, se recoge plasma sanguíneo después de someter la sangre a separación por centrifugación, y después se añade actina a la misma. Además, se añade cloruro de calcio. Se mide el periodo de tiempo hasta que se forma coagulación. Más en detalle, el plasma sanguíneo se almacena en un refrigerador después de obtenerse a través de separación por centrifugación de la sangre. Se vierte 0,1 ml de agente de activación, que se había calentado en un baño de agua que tenía una temperatura de 37°C durante un minuto, en un tubo de ensayo que contenía 0,1 ml del plasma. La mezcla se deja reposar en un baño de agua a 37°C durante dos minutos. Después a esta mezcla se añade a presión 0,1 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,02 M, que se había colocado en un baño de agua que tenía una temperatura 37°C. En este momento se enciende un cronómetro. El tubo de ensayo se calienta en el baño de agua de 37°C durante 25 segundos. Se saca el tubo de ensayo, y si se observa coagulación, se apaga el cronómetro. Este es un modo en que puede medirse el tiempo de coagulación de la sangre.

El ensayo de tiempo de hemorragia puede usarse para el diagnóstico de disfunción hemostática, la enfermedad de von Willebrand, y trastornos vasculares. También puede usarse para explorar anomalías plaquetarias antes de cirugía. El ensayo se realiza haciendo una pequeña incisión en el antebrazo y disipando la sangre desde el sitio de la herida. Se registra el tiempo que tarda la hemorragia en detenerse y en sujetos de control es aproximadamente 3,5 minutos. Una prolongación del tiempo de hemorragia es indicativa de defectos plaquetarios cualitativos o cuantitativos.

El Ensayo de Tiempo de Protrombina (PT), que se describió por primera vez por Quick en 1935, mide el tiempo de coagulación inducida por factor tisular de la sangre o el plasma. Se usa como ensayo de exploración para evaluar la integridad de la vía de coagulación extrínseca, y es sensible a los factores de coagulación I, II, V, VII, y X. El ensayo puede realizarse añadiendo tromboplastina y  $\text{Ca}^{2+}$  a la muestra de un paciente y midiendo el tiempo para la formación de coágulos. Un tiempo de coagulación prolongado sugiere la presencia de un inhibidor de, o una deficiencia en, uno o más de los factores de coagulación de la vía extrínseca. Pero el tiempo de coagulación del PT también puede estar prolongado en pacientes en terapia con warfarina, o en aquellos con deficiencia de vitamina K o disfunción hepática. El ensayo de PT puede proporcionar una evaluación de la vía de coagulación extrínseca, y se usa ampliamente para controlar terapias de anticoagulación oral.

El Ensayo de Tiempo de Coagulación de Trombina (TCT) mide la velocidad de formación de coágulos de un paciente en comparación con la de un control de plasma normal. El ensayo puede realizarse añadiendo una cantidad convencional de trombina al plasma de un paciente que se ha desprovisto de plaquetas, y midiendo el tiempo requerido para que se forme un coágulo. Este ensayo se ha usado como auxiliar en el diagnóstico de coagulación intravascular diseminada (DIC) y enfermedad hepática.

También hay varios ensayos que pueden usarse en el diagnóstico del estado de coagulación de un paciente. Estos están en dos categorías: ensayos complejos, algunos de los cuales están basados en los ensayos de exploración mostrados anteriormente, e inmunoensayos. Los ensayos complejos incluyen ensayos de factor específico basados en ensayos de laboratorio, tales como los ensayos de APTT, PT, y TCT. Un ensayo mide el nivel de péptido de activación factor IXa o el complejo factor IXa-antitrombina III. Estas mediciones se usan para determinar los niveles de complejo de factor IXa o factor VII mediado por tejido. Ensayos para la resistencia a proteína C activada, antitrombina, deficiencia de proteína C, y deficiencia de proteína S también son parte de este grupo. Individuos asintomáticos que tienen deficiencias heterogéneas de proteínas C y S, y resistencia a proteína C activada, tienen niveles significativamente elevados del fragmento de protrombina F1.2 en comparación con los controles.

### V. Método para Regular la Terapia con Ligando de Ácido Nucleico

Se proporciona un método para modular la actividad biológica que incluye (i) administrar a un paciente que lo necesite un ligando de ácido nucleico que se una a una diana para producir un efecto terapéutico, y después en el momento seleccionado o deseado, (ii) administrar al paciente un modulador que modifique el efecto terapéutico. En un caso, el modulador desactiva el efecto terapéutico. En otra realización, el modulador reduce o minimiza pero no interrumpe el efecto terapéutico.

El efecto terapéutico básico está determinado por la diana y el ligando de ácido nucleico. La modificación del efecto terapéutico está determinada por el modulador. Puede regularse cualquier ligando de ácido nucleico conocido o desarrollado de acuerdo con esta invención.

En una realización, el método comprende: (a) administrar a un paciente, incluyendo cualquier vertebrado de sangre caliente que lo necesite, una cantidad eficaz de un ligando de ácido nucleico o aptámero de ADN que se una selectivamente a un factor de la vía de coagulación, teniendo el aptámero de ARN una constante de disociación para el factor de la vía de coagulación de aproximadamente 20 nM o menos; (b) modular la actividad biológica del factor de la vía de coagulación en el vertebrado de sangre caliente a través de la administración del aptámero de ARN de la etapa (a); y (c) proporcionar un antídoto para revertir los efectos del aptámero por la administración de un modulador. Por ejemplo, los moduladores de la presente invención pueden unirse a ligandos de ácido nucleico que están dirigidos a los complejos enzimáticos de factor tisular (TF)/factor VIIa (FVIIa), factor VIIIa (FVIIIa)/factor IXa (FIXa),

factor Va (FVa)/factor Xa (FXa) y receptores plaquetarios tales como gpIIb/IIIa y gpIb/IX y modulan los efectos del ligando de ácido nucleico. Esta invención también proporciona el control con antídoto de inhibidores plaquetarios, antitrombóticos y fibrinolíticos.

5 Existen al menos tres escenarios clínicos en los que es deseable la capacidad de revertir rápidamente la actividad de un ligando de ácido nucleico antitrombótico o anticoagulante. El primer caso es cuando el tratamiento anticoagulante o antitrombótico conduce a hemorragia, incluyendo hemorragia intracraneal o gastrointestinal. Aunque la identificación de proteínas diana más seguras puede reducir este riesgo, el potencial de morbilidad o mortalidad a partir de este tipo de acontecimiento hemorrágico es tal que el riesgo no puede pasarse por alto. El segundo caso es cuando se requiere  
10 cirugía urgente para pacientes que han recibido tratamiento antitrombótico. Esta situación clínica surge en un bajo porcentaje de pacientes que requieren injertos de derivación de la arteria coronaria urgentes mientras experimentan intervención coronaria percutánea bajo la cobertura de inhibidores de GPIIb/IIIa. La práctica actual en esta situación es dejar que se elimine el compuesto (para antagonistas de molécula pequeña tales como eptifibatida), que puede tardar 2-4 horas, o infusión de plaquetas (para tratamiento con Abciximab). El tercer caso es cuando se usa un ligando de  
15 ácido nucleico anticoagulante durante un procedimiento de derivación cardiopulmonar. Los pacientes con derivación están predispuestos a hemorragia post-operatoria. En cada caso, una reversión aguda de los efectos anticoagulantes de un compuesto mediante un antídoto (por ejemplo, un modulador oligonucleotídico de la invención dirigido contra un ligando de ácido nucleico anticoagulante o antitrombótico) permite un control médico mejorado, y probablemente más seguro, del compuesto anticoagulante o antitrombótico.

20 En un método para tratar enfermedades cardiovasculares en pacientes, el método comprende administrar una cantidad eficaz de un aptámero de ARN que se une selectivamente a un factor de la vía de coagulación, teniendo el aptámero de ARN una constante de disociación para el factor de la vía de coagulación de aproximadamente 20 nM o menos, a un sujeto vertebrado que padece una enfermedad cardiovascular, por lo cual se trata la enfermedad cardiovascular en el sujeto vertebrado, después proporcionar un antídoto para revertir los efectos del aptámero por la administración de un modulador.

El paciente tratado en la presente invención en sus muchas realizaciones es deseablemente un paciente humano, aunque tiene que entenderse que los principios de la invención indican que la invención es eficaz con respecto a todas  
30 las especies vertebradas, incluyendo vertebrados de sangre caliente (por ejemplo, aves y mamíferos), que pretenden incluirse en el término "paciente". En este contexto, se entiende que un mamífero incluye cualquier especie de mamífero en la que es deseable el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, particularmente especies de mamíferos agrícolas y domésticos.

35 Se contempla el tratamiento de mamíferos tales como los seres humanos, así como aquellos mamíferos de importancia debido a que están en peligro de extinción (tal como el tigre siberiano), de importancia económica (animales criados en granjas para el consumo por seres humanos) y/o de importancia social (animales mantenidos como mascotas o en zoológicos) para los seres humanos, por ejemplo, carnívoros diferentes a los seres humanos (tales como gatos y perros), ganado porcino (cerdos, verracos, y jabalíes), ruminantes (tal como ganado vacuno, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes, y camellos), y caballos. También se contempla el tratamiento de aves, incluyendo  
40 el tratamiento de aquellos tipos de aves que están en peligro de extinción, mantenidos en zoológicos, así como aves de caza, y más particularmente aves de caza domesticadas, es decir, aves de corral, tales como pavos, pollos, patos, gansos, gallinetas, y similares, ya que son también de importancia económica para los seres humanos.

45 El presente método para tratar enfermedades cardiovasculares en un tejido contempla poner en contacto un tejido en el que está sucediendo la enfermedad cardiovascular, o está en riesgo de suceder, con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un aptámero de ARN capaz de unirse a un factor de coagulación así como proporcionar un antídoto para revertir los efectos del aptámero por la administración de un modulador. Por tanto, el método comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición fisiológica-  
50 mente tolerable que contiene el aptámero de ARN así como un método para proporcionar un antídoto para revertir los efectos del aptámero por la administración de un modulador.

Los intervalos de dosificación para la administración del modulador dependen de la forma del modulador, y su potencia, como se describe adicionalmente en este documento, y son cantidades suficientemente grandes para producir  
55 el efecto deseado. Para situaciones en las que se modula la coagulación, que puede mejorar correspondientemente la enfermedad cardiovascular y los síntomas de la enfermedad cardiovascular, la dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, fallo cardíaco congestivo, y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, el estado, sexo y grado de la enfermedad en el paciente y puede determinarla un especialista en la técnica. El médico en el caso de cualquier complicación también  
60 puede ajustar la dosificación.

Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de un modulador suficiente para producir una modulación medible de los efectos del ligando de ácido nucleico, incluyendo, aunque sin limitación, una cantidad moduladora de la coagulación. La modulación de la coagulación puede medirse *in situ* por inmunohistoquímica por métodos descritos  
65 en los Ejemplos, o por otros métodos conocidos para un especialista en la técnica.

Un modulador preferido tiene la capacidad de unirse sustancialmente a un ligando de ácido nucleico en solución a concentraciones de modulador de menos de uno (1) micromolar ( $\mu\text{M}$ ), preferiblemente menos de 0,1  $\mu\text{M}$ , y más

preferiblemente menos de 0,01  $\mu$ M. Por “sustancialmente” se entiende que se observa al menos un 50 por ciento de reducción en la actividad biológica diana por modulación en presencia de la diana, y la reducción del 50% se menciona en este documento como el valor de IC<sub>50</sub>.

5 Los modos preferidos de administración de los materiales de la presente invención a un hospedador mamífero son por vía parenteral, intravenosa, intradérmica, intra-articular, intrasinoval, intratecal, intra-arterial, intracardiaca, intramuscular, subcutánea, intraorbital, intracapsular, intramedular, intraesternal, tópica, por parche transdérmico, mediante supositorio rectal, vaginal o uretral, vía peritoneal, percutánea, pulverización nasal, implante quirúrgico, implante quirúrgico interno, bomba de infusión o mediante catéter. En una realización, el agente y el vehículo se administran en  
10 una formulación de liberación lenta tal como un implante, bolo, micropartícula, microesfera, nanopartícula o nanoesfera. Para información convencional sobre formulaciones farmacéuticas, véase Ansel, *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Sexta Edición, Williams & Wilkins (1995).

Los moduladores de la presente invención pueden administrarse preferiblemente por vía parenteral por inyección o por infusión gradual en el tiempo. Aunque al tejido a tratar puede accederse típicamente en el cuerpo por administración sistémica y por lo tanto a menudo se trata por administración intravenosa de composiciones terapéuticas, se proporcionan otros tejidos y técnicas de suministro donde existe la probabilidad de que el tejido marcado como diana contenga la molécula diana. Por tanto, los moduladores de la presente invención se administran típicamente por vía oral, vía tópica a un tejido vascular, vía intravenosa, vía intraperitoneal, vía intramuscular, vía subcutánea, al interior de una cavidad, vía transdérmica, y pueden suministrarse por técnicas peristálticas. Como se ha indicado anteriormente, las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse al individuo por una diversidad de vías tales como oral, tópica a un tejido vascular, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, al interior de una cavidad, transdérmica, y pueden suministrarse por técnicas peristálticas. Los enfoques no limitantes representativos para administración tópica a un tejido vascular incluyen (1) recubrimiento o impregnación de un tejido de vaso sanguíneo con un gel que comprende un ligando de ácido nucleico, para el suministro *in vivo*, por ejemplo, por implante del vaso recubierto o impregnado en el lugar de un segmento tisular del vaso dañado o enfermo que se retiró o derivó; (2) suministro mediante un catéter a un vaso en el que se desea el suministro; (3) bombeo de una composición de ligando de ácido nucleico en un vaso que tiene que implantarse en un paciente. Como alternativa, el ligando de ácido nucleico puede introducirse en las células por microinyección, o por encapsulación en liposomas. De forma ventajosa, los  
30 ligandos de ácido nucleico de la presente invención pueden administrarse en una única dosis diaria, o la dosificación diaria total puede administrarse en varias dosis divididas. Después de ello, se proporciona el modulador por cualquier medio adecuado para alterar el efecto del ligando de ácido nucleico por la administración del modulador.

Las composiciones se administran de un modo compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el ingrediente activo, y el grado deseado del efecto terapéutico. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas a administrar dependen del criterio del médico y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, en este documento se describen intervalos de dosificación adecuados para aplicación sistémica y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para su administración también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas por una inyección posterior u otra administración. Como alternativa, se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones en la sangre en los intervalos especificados para terapias *in vivo*.

Como se usa en este documento, las expresiones “farmacéuticamente aceptable”, “fisiológicamente tolerable”, y variaciones gramaticales de las mismas, que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan de forma intercambiable y representan que los materiales se pueden administrar sin efectos secundarios tóxicos sustanciales o debilitantes.

Las composiciones farmacéuticamente útiles que comprenden un modulador de la presente invención pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos tales como por mezcla de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Pueden encontrarse ejemplos de dichos vehículos y métodos de formulación en *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Para formar una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para su administración eficaz, dichas composiciones contendrán una cantidad eficaz del aptámero. Dichas composiciones pueden contener mezclas de más de un modulador.

55 La cantidad eficaz puede variar de acuerdo con una diversidad de factores tales como el estado del individuo, su peso, sexo, edad y la cantidad de ligando de ácido nucleico administrada. Otros factores incluyen el modo de administración. Generalmente, las composiciones se administrarán en dosificaciones ajustadas para el peso corporal, por ejemplo, dosificaciones que varían de aproximadamente 1  $\mu$ g/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente, de 1 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal.

Los moduladores de ligandos de ácido nucleico pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades en las que es beneficioso inhibir la coagulación, o evitar que suceda dicha actividad. Las composiciones farmacéuticas se administran en cantidades terapéuticamente eficaces, es decir, en cantidades suficientes para generar una respuesta moduladora de la actividad de coagulación, o en cantidades profilácticamente eficaces, es decir, en cantidades suficientes para evitar que un factor de coagulación actúe en una cascada de coagulación. La cantidad terapéuticamente eficaz y la cantidad profilácticamente eficaz pueden variar de acuerdo con el tipo de modulador. La composición farmacéutica puede administrarse en dosis únicas o múltiples.

Generalmente, los moduladores oligonucleotídicos de la invención pueden administrarse usando protocolos establecidos usados en terapia antisentido. Los datos presentados en el Ejemplo 6 indican que la actividad de un ligando de ácido nucleico terapéutico puede modularse por infusión intravenosa de antídotos oligonucleotídicos en un ser humano u otro animal. Además, como la actividad del modulador es duradera, una vez se ha conseguido el nivel deseado de modulación del ligando de ácido nucleico por el modulador, puede interrumpirse la infusión del modulador, permitiendo que el modulador residual se elimine del ser humano o animal. Esto permite el re-tratamiento posterior con el ligando de ácido nucleico según sea necesario. Como alternativa, y en vista de la especificidad de los moduladores de la invención, el tratamiento posterior puede implicar el uso de un segundo par ligando de ácido nucleico/modulador (por ejemplo, oligonucleótido) diferente.

Los moduladores sintetizados o identificados de acuerdo con los métodos descritos en este documento pueden usarse solos a dosificaciones apropiadas definidas por ensayo rutinario para obtener la modulación óptima de la actividad del ligando de ácido nucleico en la coagulación, minimizando al mismo tiempo cualquier toxicidad potencial. Además, puede ser deseable la coadministración o administración secuencial de otros agentes. Para el tratamiento de combinación con más de un agente activo, donde los agentes activos están en formulaciones de dosificación diferentes, los agentes activos pueden administrarse de forma concurrente, o cada uno puede administrarse a tiempos escalonados por separado.

El régimen de dosificación utilizando los moduladores de la presente invención se selecciona de acuerdo con una diversidad de factores incluyendo el tipo, especie, edad, peso, sexo y estado médico del paciente; la gravedad de la afección a tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el modulador particular empleado. Un médico especialista en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz del aptámero requerida para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección. La precisión óptima para conseguir concentraciones del modulador dentro del intervalo que produce eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del modulador para los sitios diana. Esto implica una consideración de la distribución, equilibrio, y eliminación del modulador.

En el uso de la presente invención, los moduladores descritos en este documento con detalle pueden formar el ingrediente activo, y se administran típicamente en mezcla con diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados (colectivamente mencionados en este documento como materiales de "vehículo") adecuadamente seleccionados con respecto a la forma pretendida de administración, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes, supositorios, geles y similares, y coherentes con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Por ejemplo, para administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo puede combinarse con un vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable, no tóxico, oral tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados en la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen sin limitación, almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, goma de tragacanto o alginato sódico, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen, sin limitación, oleato sódico, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, goma de agar, bentonita, goma xantana y similares.

Para formas líquidas, el componente de fármaco activo puede combinarse en agentes de suspensión o dispersión aromatizados adecuadamente tales como las gomas sintéticas y naturales, por ejemplo, goma de tragacanto, goma arábiga, metilcelulosa y similares. Otros agentes de dispersión que pueden emplearse incluyen glicerina y similares. Para administración parenteral, se desean suspensiones y soluciones estériles. Se emplean preparaciones isotónicas que generalmente contienen conservantes adecuados cuando se desea administración intravenosa.

Las preparaciones tópicas que contienen el componente de fármaco activo pueden mezclarse con una diversidad de materiales de vehículo bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, alcoholes, gel de aloe vera, alantoína, glicerina, aceites de vitamina A y E, aceite mineral, propionato de PPG2 miristilo, y similares, para formar, por ejemplo, soluciones alcohólicas, limpiadores tópicos, cremas limpiadoras, geles cutáneos, lociones cutáneas, y champúes en formulación de crema o gel.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de suministro de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de una diversidad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Los compuestos de la presente invención también pueden acoplarse con polímeros solubles como vehículos de fármacos dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacril-amidafenol, polihidroxietilaspártamidafenol, o polietilenoóxidopolilisina sustituida con restos de palmitoilo. Además, los compuestos de la presente invención pueden acoplarse (preferiblemente mediante un enlace covalente) a una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliace-tales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles. Puede unirse colesterol y moléculas similares a los aptámeros para aumentar y prolongar la biodisponibilidad.

## ES 2 351 784 T3

Los moduladores oligonucleotídicos pueden administrarse directamente (por ejemplo, solos o en una formulación liposómica o en complejo con un vehículo (por ejemplo, PEG)) (véanse, por ejemplo, los documentos USP 6.147.204, USP 6.011.020).

5 El ligando de ácido nucleico o modulador puede estar compuesto por un modulador oligonucleotídico unido a un compuesto de elevado peso molecular no inmunogénico como polietilenglicol (PEG). En esta realización, las propiedades farmacocinéticas del complejo están mejoradas con relación al ligando de ácido nucleico solo. Como se ha analizado *supra*, la asociación podría ser a través de enlaces covalentes o interacciones no covalentes. En una realización, el modulador se asocia con la molécula de PEG a través de enlaces covalentes. También, como se ha analizado  
10 *supra*, cuando se emplea unión covalente, el PEG puede unirse covalentemente en una diversidad de posiciones en el modulador oligonucleotídico. En la realización preferida, se une un modulador oligonucleotídico en el tiol 5' a través de una funcionalidad maleimida o vinilsulfona. En una realización, puede asociarse una pluralidad de moduladores con una única molécula de PEG. El modulador puede ser para la misma diana o una diferente. En realizaciones en las que hay múltiples moduladores para el mismo ligando de ácido nucleico, hay un aumento en la avidéz debido a  
15 las múltiples interacciones de unión con el ligando. En una realización adicional más, puede unirse una pluralidad de moléculas de PEG entre sí. En esta realización, puede asociarse uno o más moduladores a la misma diana o diferentes dianas con cada molécula de PEG. Esto también provoca un aumento en la avidéz de cada modulador por su diana. En realizaciones en las que se unen múltiples moduladores específicos por la misma diana a PEG, existe la posibilidad de poner las mismas dianas en cercana proximidad entre sí para generar interacciones específicas entre las mismas dianas.  
20 Cuando se unen múltiples moduladores específicos para diferentes dianas a PEG, existe la posibilidad de poner las distintas dianas en cercana proximidad entre sí para generar interacciones específicas entre las dianas. Además, en realizaciones en las que hay moduladores para la misma diana o diferentes dianas asociados con PEG, también puede asociarse un fármaco con PEG. Por tanto el complejo proporcionaría un suministro dirigido del fármaco, sirviendo PEG como enlazador.

25 Un problema encontrado en el uso terapéutico y diagnóstico *in vivo* de ácidos nucleicos es que los oligonucleótidos en su forma fosfodiéster pueden degradarse rápidamente en fluidos corporales por enzimas intracelulares y extracelulares tales como endonucleasas y exonucleasas antes de manifestarse el efecto deseado. Pueden hacerse ciertas modificaciones químicas del ácido nucleico para aumentar la estabilidad *in vivo* del ácido nucleico o para potenciar o para mediar el suministro del ácido nucleico. Las modificaciones de los ligandos de ácido nucleico contempladas  
30 en esta invención incluyen, aunque sin limitación, las que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, capacidad de polarización, hidrofobicidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática, y flexibilidad estereoquímica a las bases del ácido nucleico o al ácido nucleico como conjunto. Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitación, modificaciones del azúcar en la posición 2', modificaciones de la pirimidina en la posición 5,  
35 modificaciones de la purina en la posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo; modificaciones de la estructura, modificaciones fosforotioato o alquilfosfato, metilaciones, combinaciones de pares de bases inusuales tales como las isobases isocitidina y isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5' tales como recubrimiento.

40 Los compuestos lipófilos y los compuestos de elevado peso molecular no inmunogénicos con los que pueden formularse los moduladores de la invención para su uso en la presente invención pueden prepararse por cualquiera de diversas técnicas actualmente conocidas en la técnica o desarrolladas posteriormente. Típicamente, se preparan a partir de un fosfolípido, por ejemplo, diestearoil fosfatidilcolina, y pueden incluir otros materiales tales como lípidos neutros, por ejemplo, colesterol, y también tensioactivos tales como compuestos cargados positivamente (por ejemplo, estearilamina o aminomanosa o derivados aminomanitol de colesterol) o cargados negativamente (por ejemplo, diacetilfosfato, fosfatidilglicerol). Pueden formarse liposomas multilamelares por la técnica convencional, es decir, depositando un lípido seleccionado sobre la pared lateral de un envase o recipiente adecuado disolviendo el lípido en un disolvente apropiado, y después evaporando el disolvente para dejar una delgada película sobre el interior del recipiente o secando por pulverización. Después se añade una fase acuosa al recipiente con un movimiento de remo-  
45 lino o vórtice que provoca la formación de VML. Después pueden formarse VU por homogeneización, sonicación o extrusión (a través de filtros) de VML. Además, pueden formarse VU por técnicas de retirada de detergente. En ciertas realizaciones de esta invención, el complejo comprende un liposoma con uno o más ligandos de ácido nucleico de direccionamiento asociados con la superficie del liposoma y un agente terapéutico o de diagnóstico encapsulado. Los liposomas preformados pueden modificarse para asociarse con los ligandos de ácido nucleico. Por ejemplo, un  
50 liposoma catiónico se asocia a través de interacciones electrostáticas con el ácido nucleico. Como alternativa, puede añadirse un ácido nucleico unido a un compuesto lipófilo, tal como colesterol, a liposomas preformados por lo cual el colesterol llega a asociarse con la membrana liposómica. Como alternativa, el ácido nucleico puede asociarse con el liposoma durante la formulación del liposoma. Preferiblemente, el ácido nucleico se asocia con el liposoma cargándolo en liposomas preformados.

60 Como alternativa, los moduladores oligonucleotídicos de la invención pueden producirse *in vivo* después de la administración de una construcción que comprende una secuencia que codifica el oligonucleótido. Pueden usarse técnicas disponibles para realizar el suministro intracelular de moduladores de ARN de la expresión génica (véase en líneas generales, Sullenger *et al.*, Mol. Cell Biol. 10: 6512 (1990)).

65 Ciertos aspectos de la invención pueden describirse con mayor detalle en los siguientes Ejemplos no limitantes.

## Ejemplo 1

*Aptámero Contra el Factor IXa*

5 Se generaron aptámeros modificados con 2'-fluoro pirimidina resistentes a nucleasa contra el Factor de coagulación IXa humano como se describe en el documento WO 0226932 A2. Se realizaron ocho ciclos iterativos de selección, produciendo una familia de 16 aptámeros con elevada afinidad por FIXa; variando las  $K_D$  de ~0,6-15 nM en salinidad y pH fisiológicos a 37°C. El análisis comparativo de secuencias hizo posible predecir y sintetizar la versión minimizada del aptámero de mayor afinidad, llamado ARN 9.3t ("t" por truncado), mostrado en la Fig. 1. Este aptámero de 34  
 10 nucleótidos tiene un peso molecular de 11,5 kDa y se une a FIXa con esencialmente la misma afinidad que la secuencia de longitud completa ( $K_D$  0,6 nM). Como control, se sintetizó una versión mutante del ARN 9.3t llamada 9.3tM en la que las A absolutamente conservadas en el bucle interno se mutaron en G (Fig. 1). Este aptámero se une a FIXa con una  $K_D$  >5  $\mu$ M determinada por ensayos de unión competitiva. En todos los ensayos de actividad, se emplea el ARN 9.3tM como control para medir cualquier efecto no específico causado por un aptámero de esta composición. El  
 15 aptámero 9.3t bloquea la activación de FX por FVIIIa/FIXa/lípidos, y también bloquea parcialmente la hidrólisis del sustrato sintético por FIXa.

Para examinar la especificidad del aptámero por FIXa frente a los factores de coagulación estructuralmente similares, se midió la afinidad de 9.3t por FIX, FVIIa, FXa, FXIa y APC en ensayos de unión directa como se ha descrito previamente (Rusconi *et al.*, Thrombosis and Haemostasis 83: 841-848 (2000)). El aptámero se une a FIX solamente ~5-50 veces menos fuertemente que FIXa. No logró mostrar unión significativa a concentraciones proteicas de hasta 5  $\mu$ M (ARN de la fracción unida <10%) a cualquier otra proteína ensayada. Por lo tanto, la especificidad del aptámero 9.3t por FIXa frente a FVIIa, FXa, FXIa o APC es >5000 veces.

25 Para determinar la potencia anticoagulante del ARN 9.3t, se ha evaluado la capacidad de 9.3t de prolongar el tiempo de coagulación de plasma humano en ensayos de coagulación del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y el tiempo de protrombina (PT). El aptámero 9.3t, pero no el aptámero de control 9.3tM, era capaz de prolongar el tiempo de coagulación de plasma humano de un modo dependiente de la dosis (Fig. 2). Ningún aptámero tuvo efecto sobre el PT, lo que demuestra la especificidad funcional del aptámero 9.3t por FIXa y lo que demuestra que este tipo  
 30 de oligonucleótido, a concentraciones de hasta 1  $\mu$ M, no aumenta de forma no específica el tiempo de coagulación de plasma humano. Por tanto, el ARN 9.3 es un potente anticoagulante, con un efecto máximo sobre el APTT similar al observado en plasma deficiente en FIX. Se han realizado experimentos similares en plasma porcino, y se ha observado potencia y especificidad similares.

35 Para determinar si esta molécula es capaz de inhibir la actividad de FIX/FIXa *in vivo*, se ensayó la capacidad de este aptámero de anticoagular sistémicamente pequeños cerdos (1,5-4 kg) después de inyección intravenosa en embolada. Para estos experimentos, se puso un catéter intravenoso en la vena femoral para la inyección de la muestra y se puso un catéter arterial en una arteria femoral del animal para la extracción en serie de muestras sanguíneas. Se tomó una muestra sanguínea previa a la inyección, y se midió el tiempo de ACT en el sitio para establecer un  
 40 tiempo de coagulación de sangre completa basal para el animal. Después se suministró el aptámero 9.3t a dosis de 0,5 mg/kg (n=4) y 1,0 mg/kg (n=4), el aptámero 9.3tM a 1,0 mg/kg (n=3) o vehículo (n=3) por inyección intravenosa en embolada. Se tomaron muestras sanguíneas a diversos tiempos después de la inyección, y se determinó inmediatamente el ACT. Se extrajo sangre adicional para la determinación de los APTT a diferentes tiempos después de la inyección. Como se muestra en la Fig. 3, el aptámero 9.3t, pero no el aptámero de control 9.3tM o el vehículo, era capaz de inhibir  
 45 la actividad de FIXa *in vivo* como se evidencia por un aumento significativo dependiente de la dosis en el ACT del animal después de la inyección. Como se muestra en la Fig. 4, el aptámero 9.3 prolongaba específicamente el APTT, pero no el PT de los animales de un modo dependiente de la dosis. Usando las curvas de respuesta a dosis *in vitro* de los experimentos de APTT, puede estimarse el cambio en la concentración plasmática de 9.3t en el tiempo después de la inyección.

50 Como intento de aumentar la biodisponibilidad de 9.3t, se sintetizó una versión de este aptámero con un resto 5' de colesterol, llamada 9.3t-C. El aptámero modificado con colesterol retenía la elevada afinidad de unión a FIXa (Fig. 5A) y la potente actividad anticoagulante (Fig. 5B y 5C). Los efectos *in vivo* de esta modificación en la vida media en circulación de 9.3t-C frente a 9.3t (n=2 animales para cada aptámero) se han ensayado usando el modelo de  
 55 anticoagulación sistémica de cerdo. Después de la inyección de 0,5 mg/kg de 9.3t-C, el ACT del animal aumentaba ~1,4 veces y se mantenía a este nivel durante 1 hora después de la inyección (Fig. 6A). La Fig. 6B muestra el análisis del APTT y el PT de los animales a partir de este experimento. Aunque la potencia anticoagulante de los dos aptámeros es similar, la duración del efecto anticoagulante de 9.3t-C es significativamente más largo (Fig. 6C).

## Ejemplo 2

*Oligonucleótido que Revierte la Interacción del Aptámero contra el FIXa con el FIXa de Coagulación*

65 El modelo de estructura secundaria de 9.3t se muestra en la Fig. 1 y se desarrolló a partir de análisis comparativo de secuencias de las secuencias relacionadas del aptámero contra el FIXa mostradas en la Fig. 7. Estos datos apoyan fuertemente la formación de la estructura de tronco-bucle representada en la Fig. 1. Además, el análisis mutacional del aptámero 9.3t demostró que la alteración del tronco 1 o el tronco 2 provocaba una pérdida mayor de 1000 veces

de la afinidad por FIXa. Por lo tanto, se diseñó un oligonucleótido de 17 restos todos 2' O-metilo (secuencia 5' auggg gaggcagcauuu 3') (Anti-D1) complementario a la mitad 3' del aptámero 9.3t que comienza en el extremo 5' del bucle 2 (L2 en la Fig. 7) y que se extiende hasta el extremo 3' del aptámero. Este diseño permite la nucleación de un dúplex intermolecular entre el oligonucleótido y el bucle 2 del aptámero. Además, la formación del dúplex intermolecular está termodinámicamente favorecida debido tanto a la longitud como a la composición de bases del oligonucleótido complementario. Un dúplex ribonucleotídico de esta secuencia tiene una energía libre calculada de -26,03 kcal/mol y una  $T_m$  predicha de 75,4°C. La vida media de dicho dúplex a 37°C excedería enormemente las 24 horas.

Para determinar si este oligonucleótido podría desnaturalizar el aptámero 9.3t, se incubó el aptámero 9.3t radio-marcado (125 nM) con concentraciones crecientes del "antídoto" oligonucleotídico (de equimolar a un exceso molar de factor 8) a 37°C durante 15 minutos (-calor Fig. 8), y se visualizó la cantidad de dúplex intermolecular formado por electroforesis en gel nativo (12% de acrilamida, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, procesado en tampón 1Xtris-borato + CaCl<sub>2</sub> 2 mM) seguido de formación de imágenes con fósforo (Fig. 8). Para generar un complejo oligonucleotídico-aptámero como control de la movilidad en el gel, el oligonucleótido se hibridó con el aptámero 9.3t calentando el aptámero y un exceso molar de factor 8 del oligonucleótido a 95°C durante 5 minutos antes de la incubación a 37°C (+calor Fig. 8). Se realizó la misma serie de experimentos con un oligonucleótido sin sentido de la misma composición de bases que el antídoto oligonucleotídico (N.S. en la Fig. 8). Como puede observarse en la Fig. 8, el antídoto oligonucleotídico desnaturaliza fácilmente el aptámero 9.3t como se evidencia por la formación casi completa del complejo oligonucleotídico-aptámero cuando el oligonucleótido estaba presente a un exceso molar de factor 8 al aptámero. Además, esta interacción es muy específica, ya que no se observa complejo, con o sin calentamiento, entre el aptámero y el oligonucleótido de control sin sentido.

Para determinar si este antídoto oligonucleotídico podría revertir la actividad anticoagulante del aptámero 9.3t, se midió el APTT de plasma humano combinado en presencia de 9.3t 50 nM y concentraciones crecientes del antídoto oligonucleotídico (Fig. 9A y 9B). En este experimento, se preincubó el aptámero 9.3t 5 minutos en plasma antes de la adición del antídoto oligonucleotídico para generar complejos aptámero-FIX, después se añadió el antídoto o el oligonucleótido sin sentido, y se continuó la incubación durante 10 minutos adicionales antes de añadir CaCl<sub>2</sub> para iniciar la formación de coágulos. Como se muestra en las Fig. 9A y 9B, el antídoto oligonucleotídico es capaz de revertir de forma eficaz aproximadamente el 80% de la actividad anticoagulante del aptámero 9.3t. Sin embargo, el exceso molar del antídoto oligonucleotídico requerido para conseguir este efecto es sustancialmente mayor que la cantidad requerida para desnaturalizar de forma eficaz el aptámero en ausencia de proteína.

### Ejemplo 3

#### *Especificidad de Antídotos Oligonucleotídicos*

Para evaluar la especificidad de un antídoto oligonucleotídico, se preparó el aptámero 9.20t (véase la Fig. 10A). El tronco 1 de 9.20t es idéntico al tronco 1 del aptámero 9.3t, como lo es la mitad 3' del tronco 2. Las diferencias principales entre 9.20t y 9.3t se encuentran en el bucle 2 y el bucle 3 (compárese la Fig. 1 con la Fig. 10A).

El aptámero 9.20t se une a FIXa con una  $K_D$  comparable a la de 9.3t. Se usaron ensayos de APTT para medir el tiempo de coagulación de plasma humano como función de la concentración del aptámero 9.20t. Su potencia anti-coagulante *in vitro* en plasma humano era comparable a la de 9.3t (Fig. 10B). Se añadió el aptámero 9.20t a plasma humano a una concentración 50 nM y se dejó unir al FIX plasmático durante 5 minutos. Después se añadieron concentraciones variables del antídoto oligonucleotídico Anti D1, y se midió el APTT a los 10 minutos después de la adición del antídoto al plasma. El cambio relativo en el tiempo de coagulación causado por la adición de 9.20t al plasma no estaba afectado por la adición de este antídoto oligonucleotídico complementario al aptámero 9.3t (Fig. 10C).

### Ejemplo 4

#### *Aptámero 9.3t con Tramo Final*

Para determinar si un "tramo final" monocatenario añadido al extremo de un aptámero promueve la asociación de un "antídoto" oligonucleotídico con el aptámero, se añadió un tramo final 3' al aptámero 9.3t, denominándose el aptámero con tramo final 9.3t-3NT (Fig. 11). El tramo final 3' de 9.3t-3NT es un tramo de ARN modificado de 3 nucleótidos 2' O-metilo. Esta secuencia final se eligió para reducir la probabilidad de afectar a la actividad del aptámero, y para reducir las estructuras secundarias potenciales dentro del antídoto oligonucleotídico complementario.

La afinidad del aptámero 9.3t-3NT se comparó con 9.3t en ensayos de unión competitiva (Fig. 12A). La afinidad del aptámero 9.3t-3NT por FIXa era comparable a la de 9.3t ( $K_D$  1,5 nM o menos). Se usaron ensayos de APTT para medir el tiempo de coagulación de plasma humano como función de la concentración de los aptámeros 9.3t-3NT y 9.3t (Fig. 12B). Las actividades anticoagulantes de los aptámeros eran similares, y ambos aptámeros eran capaces de inhibir completamente la actividad de FIX en plasma humano.

Se añadió el aptámero 9.3t-3NT a plasma humano a una concentración 50 nM (aumento de ~3 veces en el APTT) y se dejó unir al FIX plasmático durante 5 minutos. Después se añadieron concentraciones variables de los antídotos oligonucleotídicos (véase la Fig. 11), y se midió el APTT a los 10 minutos después de la adición de antídoto al plasma

## ES 2 351 784 T3

(Fig. 13A). La fracción de la actividad anticoagulante revertida por el antídoto oligonucleotídico es la diferencia entre el APTT en presencia de aptámero solo y el APTT en presencia de aptámero + antídoto dividido por el cambio en el APTT sobre la medida inicial en presencia del aptámero solo (0 = sin efecto, 1 = reversión completa). Cada uno de los antídotos oligonucleotídicos complementarios ensayados era capaz de revertir >90% de la actividad anticoagulante del aptámero 9.3t-3NT en 10 minutos desde la adición en plasma humano, demostrando con AS3NT-3 la actividad de reversión más potente (Fig. 13B). Esta actividad de reversión es comparable con la capacidad de la protamina de revertir el aumento del APTT después de la adición de heparina a plasma humano.

La reversión de la actividad anticoagulante de 9.3t-3NT por el antídoto oligonucleotídico AS3NT-3 se comparó con la reversión de la actividad anticoagulante de 9.3t por el antídoto oligonucleotídico Anti D1. La adición del tramo final al aptámero aumenta la eficacia de la reversión por un antídoto oligonucleotídico con secuencias complementarias al tramo final 3' del aptámero (Fig. 14A y 14B).

Además de lo anterior, se han producido los siguientes moduladores oligonucleotídicos que están dirigidos al aptámero 9.3t, y son eficaces en la reversión de su actividad anticoagulante en plasma humano *in vitro* (todos son 2'O-metil oligonucleotídicos):

Anti D T1: 5' cau ggg gag gca gca uua 3'

AS 9.3t-2: 5' cau ggg gag gca gca 3'

AS 9.3t-3: 5' cau ggg gag gca 3'.

Los siguientes moduladores oligonucleotídicos están dirigidos a los aptámeros 9.3t y 9.3t-3NT, y son eficaces en la reversión de su actividad anticoagulante en plasma humano *in vitro* (todos son 2'O-metil oligonucleotídicos):

AS 5-1: 5' gca uua cgc ggu aua guc ccc ua 3'

AS 5-2: 5' cgc ggu aua guc ccc ua 3'.

Los siguientes moduladores oligonucleotídicos están dirigidos al aptámero 9.3t o al aptámero 9.3t-3NT, y son oligonucleotídicos mutantes diseñados para ensayar aspectos específicos del diseño de los oligonucleotídicos moduladores para estos aptámeros (todos son 2'O-metil oligonucleotídicos):

AS 9.3t-M: 5' cau ggg gaa gca 3' (SEC ID N° 37)

AS 9.3t-3NOH: 5' aug ggg agg ca 3' (SEC ID N° 38)

AS 3NT-3M: 5' gac aug ggg aag ca 3' (SEC ID N° 39)

AS 3NT-3 MT: 5' aca aug ggg agg ca 3' (SEC ID N° 40).

### Ejemplo 5

#### *Antídoto Oligonucleotídico para el Aptámero 9.3t*

El antídoto oligonucleotídico 5-2C (5' CGC GGU AUA GUC CCC AU) pero no una versión mezclada de este antídoto oligonucleotídico, 5-2C scr, ha demostrado revertir de forma eficaz la actividad de los aptámeros 9.3t y Peg-9.3t *in vitro* en plasma humano. Peg-9.3t es 9.3t con un polietilenglicol de 40 KDa unido a su extremo 5' mediante un enlazador.

En estos experimentos, se añadió el aptámero al plasma (9.3t 50 nM, Peg-9.3t 125 nM) y se dejó incubar durante 5 minutos. Después se añadieron los antídotos oligonucleotídicos, y se iniciaron los ensayos de APTT 10 minutos después de la adición del antídoto. Los resultados se muestran en la Figura 15.

### Ejemplo 6

#### *Rapidez y Durabilidad del Control del Aptámero 9.3t por Antídoto Oligonucleotídico*

Se añadieron los aptámeros 9.3t o Peg-9.3t a plasma humano *in vitro* a una concentración final 50 nM para 9.3t o 125 nM para Peg-9.3t, y se dejaron incubar durante 5 minutos a 37°C. Después se añadió el antídoto oligonucleotídico 5-2C al exceso molar indicado al aptámero, y se determinó la actividad residual del aptámero midiendo el tiempo de coagulación en ensayos de APTT a los tiempos indicados después de la adición del antídoto. El % de actividad

## ES 2 351 784 T3

anticoagulante residual es igual a  $1 - \frac{(T_{\text{aptámero solo}} - T_{\text{aptámero + antídoto}})}{(T_{\text{aptámero solo}} - T_{\text{basal}})} \times 100$ , donde T = tiempo de coagulación de APTT.

5 La duración de la inactivación de la actividad anticoagulante de Peg-9.3t por el antídoto oligonucleotídico 5-2C se midió *in vitro* en plasma humano. En resumen, se añadió Peg-9.3t a plasma humano a una concentración final 125 nM y se dejó incubar durante 5 minutos. Después se añadió el antídoto oligonucleotídico 5-2C a un exceso molar de factor 10, o en un experimento paralelo se añadió también solo en lugar del antídoto oligonucleotídico, y se midió el tiempo de coagulación en ensayos de APTT a diversos momentos puntuales después de la adición del antídoto. El % de actividad anticoagulante residual se determinó como anteriormente. También se midió el APTT de plasma humano no tratado en paralelo para establecer un tiempo de coagulación basal en cada momento puntual. Se descubrió que después de 5 horas de incubación a 37°C, el APTT del plasma no tratado empezaba a aumentar, lo que indica la pérdida de la actividad de formación de coágulos del plasma, y por tanto el experimento se detuvo a las 5 horas.

15 Los datos presentados en las Figuras 16 y 17 demuestran la capacidad de controlar de forma rápida y duradera la actividad anticoagulante del aptámero antagonista de FIXa 9.3t, y sus derivados, usando antídotos oligonucleotídicos. Juntos, estos datos demuestran que la aparición de la acción del antídoto es rápida, que el tiempo necesario para que el antídoto actúe es al menos en parte dependiente de la concentración de antídoto, y que una vez que el antídoto ha inactivado el aptámero, este efecto es duradero.

20 Ejemplo 7

### *Antídoto Oligonucleotídico para el Aptámero Contra el Factor de Coagulación Xa*

25 En la Figura 18A se representa un aptámero (denominado 11F7t) contra el factor de coagulación Xa que es un potente anticoagulante *in vitro* en plasma humano. En la Figura 18B se representa una versión mutante del aptámero 11F7t, denominada 11F7tM. Las alteraciones de la identidad de las posiciones mostradas en la Fig. 18B conducen a una pérdida de >1300 veces en la afinidad del aptámero mutante por el FXa de coagulación. Se añadieron concentraciones variables de los aptámeros 11F7t y 11F7tM a plasma humano *in vitro*, y después se midió el tiempo de coagulación en un ensayo de PT (Fig. 19A) o APTT (Fig. 19B). En la Figura 19, las líneas de puntos indican el cambio relativo en el tiempo de coagulación de los plasmas que contienen un 10% o menos del 1% del nivel plasmático normal de FX, lo que demuestra los potentes efectos anticoagulantes del aptámero 11F7t. Todos los datos están normalizados a la medida inicial para ese día, de modo que un valor de 1 = ausencia de cambio en el tiempo de coagulación. El aptámero 11F7t también es un potente anticoagulante del plasma humano cuando se ensaya en ensayos de coagulación de PT, como se esperaría para un inhibidor de FXa. El aptámero mutante, 11F7tM, no mostró actividad anticoagulante ni en el ensayo de PT ni en el de APTT.

40 Se exploraron los siguientes antídotos oligonucleotídicos para la capacidad de revertir la actividad anticoagulante del aptámero 11F7t *in vitro* en plasma humano:

AO 5-1: 5' CUC GCU GGG GCU CUC 3'  
AO 5-2: 5' UAU UAU CUC GCU GGG 3'  
45 AO 3-1: 5' AAG AGC GGG GCC AAG 3'  
AO 3-3: 5' GGG CCA AGU AUU AU 3'.

50 La Figura 20 muestra las secuencias de 11F7t para las que estos antídotos oligonucleotídicos son complementarios. Como se muestra en la Figura 21A, los antídotos oligonucleotídicos revierten de forma eficaz la actividad del aptámero 11F7t en plasma humano. En estos experimentos, se añadió el aptámero al plasma (concentración final 125 nM) y se dejó incubar durante 5 minutos. Después se añadieron los antídotos oligonucleotídicos, y se iniciaron los ensayos de APTT 10 minutos después de la adición del antídoto. Además de los antídotos oligonucleotídicos descritos anteriormente, también se descubrió que las siguientes secuencias tienen actividad de antídoto contra el aptámero 11F7t:

AO 3-2: 5' CAA GAG CGG GGC CAA G 3'  
60 AO 5-3: 5' CGA GUA UUA UCU UG 3'.

La Figura 21B muestra la caracterización de la actividad del antídoto 5-2 sobre un intervalo de concentración mayor de antídoto 5-2, y la comparación con la actividad de antídoto de una versión de secuencia mezclada del antídoto 5-2, 5-2scr. Los datos demuestran potente actividad de reversión del antídoto 5-2, y especificidad de la actividad del antídoto oligonucleotídico demostrada por la ausencia de actividad de reversión de AO 5-2scr.

Las Figuras 22 y 23 se refieren a la capacidad de controlar de forma rápida y duradera la actividad anticoagulante del aptámero antagonista de FXa 11F7t, y sus derivados, usando antídotos oligonucleotídicos. Juntos, estos datos demuestran que la aparición de la acción del antídoto es rápida (Fig. 22), que el tiempo necesario para que el antídoto actúe es al menos en parte dependiente de la concentración de antídoto (Fig. 22), y que una vez que el antídoto ha inactivado el aptámero, este efecto es duradero (Fig. 23). Juntos, estos datos indican que los antídotos oligonucleotídicos pueden infundirse por vía intravenosa en un ser humano u otro animal, lo que sería un método potencial para usar antídotos oligonucleotídicos para modular la actividad de un aptámero terapéutico. Además, como la actividad del antídoto es duradera, una vez se ha conseguido el nivel deseado de modulación del aptámero por el antídoto, puede interrumpirse la infusión del antídoto, permitiendo que el antídoto residual se elimine del ser humano o animal. Esto permite el re-tratamiento posterior del ser humano o animal con el aptámero según sea necesario.

#### Ejemplo 8

##### 15 *Funcionamiento Independiente de los Pares Aptámero Antídoto*

Para demostrar que los pares aptámero-antídoto (el aptámero 9.3t y su antídoto AO5-2c y el aptámero 11F7t y su antídoto AO5-2) funcionan independientemente entre sí, se añadieron los aptámeros a plasma humano a 37°C, como se indica en la Figura 24, y se dejaron incubar durante 5 minutos. Después se añadieron los antídotos y se midió la actividad de coagulación 10 minutos después de la adición del antídoto en ensayos de APTT. En todos los ensayos, se substituyó el aptámero o el antídoto por tampón solo en casos en los que se añadió solamente un aptámero o un antídoto al plasma. Todos los datos se normalizaron a la medida inicial para ese día, de modo que un valor de 1 = ausencia de cambio en el tiempo de coagulación.

25 Comparando la muestra Apt 1 y 2+AD1 con Apt 1 solo y la muestra Apt 1 y 2+AD2 con Apt 2 solo (véase la Fig. 24), queda claro que la actividad de reversión del antídoto es específica para el aptámero marcado como diana (por ejemplo, no hubo pérdida de la actividad Apt 2 en presencia de AD1 y viceversa), y la actividad del antídoto efectivamente no cambiaba por la presencia del segundo aptámero.

30 Estos resultados tienen dos importantes implicaciones. La primera, demuestran la capacidad de dosificar a un paciente un ligando de ácido nucleico 1 (por ejemplo, 9.3t), revertir ese ligando de ácido nucleico con su antídoto correspondiente, y después re-tratar al paciente con un segundo ligando de ácido nucleico. La segunda, los resultados demuestran la utilidad de los pares ligando de ácido nucleico-antídoto para la validación de dianas, y el estudio de vías bioquímicas. El antídoto posibilita determinar que la respuesta observada después de inhibir una proteína diana con un ligando de ácido nucleico se debe a la inhibición específica de esa proteína. Además, el antídoto hace posible determinar si la unión del ligando de ácido nucleico con la proteína diana conduce a la renovación de la proteína. Por ejemplo, si después de la adición del antídoto se restaura la actividad proteica completa, sostiene que no hubo cambio neto en la concentración de proteína como resultado de la unión del ligando de ácido nucleico.

#### 40 Ejemplo 9

##### *Función del Aptámero PEG-9.3t y el Antídoto 5-2C en Plasma de Pacientes con Trombocitopenia Inducida por Heparina (HIT)*

45 La capacidad de controlar la actividad anticoagulante de la heparina con protamina posibilita un tratamiento más seguro de pacientes que experimentan procedimientos que requieren un elevado nivel de anticoagulación, en los que el riesgo de hemorragia después del procedimiento es elevado. Sin embargo, el ~3-5% de los pacientes que reciben heparina desarrollan una respuesta inmunológica inducida por el fármaco llamada trombocitopenia inducida por heparina (HIT), que contraindica el tratamiento adicional de estos pacientes con heparina (Warkentin *et al.*, *Thromb Haemost* 79: 1-7. (1998)). Este trastorno está caracterizado por una disminución en el recuento de plaquetas y un riesgo aumentado de una tromboembolia nueva o recurrente amenazante de la vida y una extremidad (Warkentin *et al.*, *Thromb Haemost* 79: 1-7. (1998)). Están disponibles varios anticoagulantes alternativos, pero ninguno de estos anticoagulantes puede controlarse por un agente de reversión. Esto limita significativamente las opciones de tratamiento para pacientes con HIT, y son comunes las complicaciones hemorrágicas y las tromboembolias recurrentes aunque experimenten tratamiento (Greinacher *et al.*, *Circulation* 99: 73-80. (1999), Lewis *et al.*, *Circulation* 103: 1838-1843. (2001)). Por lo tanto, se investigó la capacidad del aptámero Peg-9.3t y el antídoto 5-2C de servir como par anticoagulante-antídoto en muestras plasmáticas de seis pacientes con HIT, tres con enfermedad renal en fase final que requerían hemodiálisis y por tanto anticoagulación repetida, y tres con complicaciones tromboembólicas que requerían terapia anticoagulante. (Los criterios serológicos incluían un ensayo positivo de agregación plaquetaria inducida por heparina (Ortel *et al.*, *Thromb Haemost* 67: 292-296. (1992)) y/o elevados niveles de anticuerpos contra heparina/factor plaquetario 4 detectados por ELISA (GTI, Inc., Brookfield, WI). Cinco pacientes cumplían los criterios tanto clínicos como serológicos; un paciente cumplía los criterios clínicos pero tenía estudios serológicos negativos.) El aptámero PEG-9.3t prolongaba los tiempos de coagulación de APTT del plasma de los seis pacientes, y el antídoto 5-2 era capaz de revertir de forma eficaz esta actividad anticoagulante a la medida inicial previa al tratamiento de cada paciente (Fig. 25). De forma importante, dos pacientes que estaban recibiendo terapia anticoagulante en el momento en que se tomaron las muestras (el paciente 3 con danaparoides sódico y el paciente 6 con warfarina), y la adición de PEG-9.3t al plasma de estos pacientes aumentaba el tiempo de coagulación sobre la medida inicial de tratamiento y el antídoto 5-2C re-

## ES 2 351 784 T3

vertía esta respuesta de nuevo a la medida inicial de tratamiento, lo que demuestra que en el plasma del paciente este par fármaco-antídoto puede funcionar independientemente de un anticoagulante “cargado”. Además, el tratamiento de estas muestras plasmáticas de los pacientes con el aptámero de control 9.3tM y el antídoto 5-2C no produjo aumento en el tiempo de coagulación, lo que indica adicionalmente que los oligonucleótidos de la composición del aptámero o el antídoto no tienen de forma inherente actividad anticoagulante significativa.

Se investigó la capacidad del aptámero 11F7t y su antídoto correspondiente 5-2 de servir como par anticoagulante-antídoto en muestras plasmáticas de 2 pacientes con HIT, uno con enfermedad renal en fase final que requería hemodiálisis y por tanto anticoagulación repetida, y uno con complicaciones tromboembólicas que requería terapia anticoagulante. El aptámero 11F7t prolongaba los tiempos de coagulación de APTT del plasma de ambos pacientes, y el antídoto 5-2 era capaz de revertir de forma eficaz esta actividad anticoagulante a la medida inicial previa al tratamiento de cada paciente (Fig. 26). De forma importante, estos dos pacientes estaban recibiendo terapia anticoagulante en el momento en que se tomaron las muestras (el paciente 3 con danaparoides sódico y el paciente 6 con warfarina), y la adición de 11F7t al plasma de estos pacientes aumentaba el tiempo de coagulación sobre la medida inicial de tratamiento y el antídoto 5-2 revertía esta respuesta de nuevo a la medida inicial de tratamiento, lo que demuestra que en el plasma de los pacientes este par fármaco-antídoto puede funcionar independientemente de un anticoagulante “cargado”. Además, el tratamiento de estas muestras plasmáticas de los pacientes con el aptámero de control 9.3tM y el antídoto 5-2 no produjo aumento en el tiempo de coagulación, lo que indica adicionalmente que los oligonucleótidos de la composición del aptámero o el antídoto no tienen de forma inherente actividad anticoagulante significativa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un modulador oligonucleotídico que hibrida en condiciones fisiológicas con un aptámero contra factores de coagulación, donde dicho aptámero es un ácido nucleico monocatenario que se une a un factor de coagulación, para revertir de forma específica y rápida los efectos anticoagulantes y antitrombóticos de dicho aptámero contra factores de coagulación que está dirigido a componentes de la vía de coagulación.
- 10 2. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 1, donde el modulador se une al aptámero contra factores de coagulación libre presente en el hospedador.
3. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 1, donde el modulador se une al aptámero contra factores de coagulación presente en el hospedador en asociación con el componente de la vía de coagulación de la sangre.
- 15 4. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 1, donde el modulador es complementario al aptámero contra factores de coagulación.
- 20 5. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 4, donde el modulador comprende una secuencia complementaria a 6-25 nucleótidos del aptámero contra factores de coagulación.
6. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 5, donde el modulador comprende una secuencia complementaria a 8-20 nucleótidos del aptámero contra factores de coagulación.
- 25 7. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 6, donde el modulador comprende una secuencia complementaria a 10-15 nucleótidos del aptámero contra factores de coagulación.
8. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 4, donde el modulador comprende 5-80 nucleótidos.
- 30 9. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 8, donde el modulador comprende 10-30 nucleótidos.
10. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 9, donde el modulador comprende 15-20 nucleótidos.
- 35 11. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 4, donde el modulador alberga una sustitución química.
- 40 12. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 11, donde el modulador comprende una pirimidina sustituida en la posición 5' o un azúcar sustituido en la posición 2'.
13. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 12, donde el modulador comprende una sustitución 2'-amino, 2'-fluoro o 2'-O-metilo.
- 45 14. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 4, donde el modulador comprende un ácido nucleico cerrado.
- 50 15. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 4, donde el modulador es complementario a una región monocatenaria de dicho aptámero contra factores de coagulación.
16. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 15, donde el modulador es complementario a una región monocatenaria del aptámero contra factores de coagulación y una región bicatenaria del aptámero contra factores de coagulación.
- 55 17. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 4, donde el aptámero contra factores de coagulación tiene un tramo final monocatenario.
- 60 18. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 17, donde el modulador es complementario al tramo final monocatenario del aptámero contra factores de coagulación.
19. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 4, donde el aptámero contra factores de coagulación y el modulador comprenden  $\beta$ -D-nucleótidos.
- 65 20. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 4, donde el modulador se produce en el hospedador después de la administración al hospedado de una construcción que comprende una secuencia que codifica el modulador.

## ES 2 351 784 T3

21. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 1, donde el aptámero contra factores de coagulación es un aptámero contra factores de coagulación anticoagulante o antitrombótico.

5 22. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 21, donde el componente de la vía de coagulación de la sangre es un complejo enzimático de factor tisular (TF)/factor VIIa (FVIIa), complejo enzimático de factor VIIIa (FVIIIa)/factor IXa (FIXa), complejo enzimático de factor Va (FVa)/factor Xa (FXa), gpIIbIIIa, gpIbIX, gpVI, Gas6, PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno I), factor de coagulación XIIIa (FXIIIa), ATIII (anti-trombina III), factor de coagulación IXa (FIXa), trombina o factor de coagulación XIa (FXIa).

10 23. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 1, donde el aptámero contra factores de coagulación alberga un marcador.

15 24. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 23, donde el marcador es un marcador citotóxico.

25 25. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 23, donde el marcador es un marcador radiactivo.

20 26. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 23, donde el marcador es un marcador detectable.

27. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 23, donde el hospedador es un ser humano.

25 28. El modulador oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 23, donde el hospedador es un mamífero no humano.

29. El modulador oligonucleotídico de la reivindicación 21, donde el componente de la vía de coagulación de la sangre es un complejo de factor VIIIa (FVIIIa)/factor IXa (FIXa).

30 30. El modulador oligonucleotídico de la reivindicación 21, donde el componente de la vía de coagulación de la sangre es el Factor IXa.

35

40

45

50

55

60

65

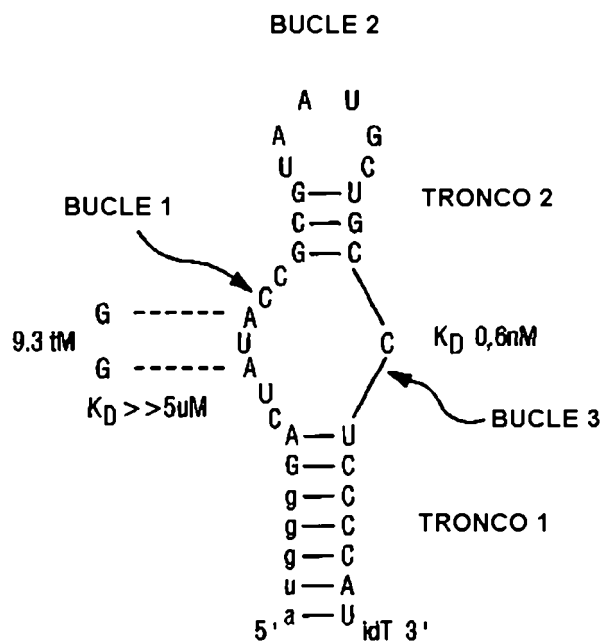


Fig. 1

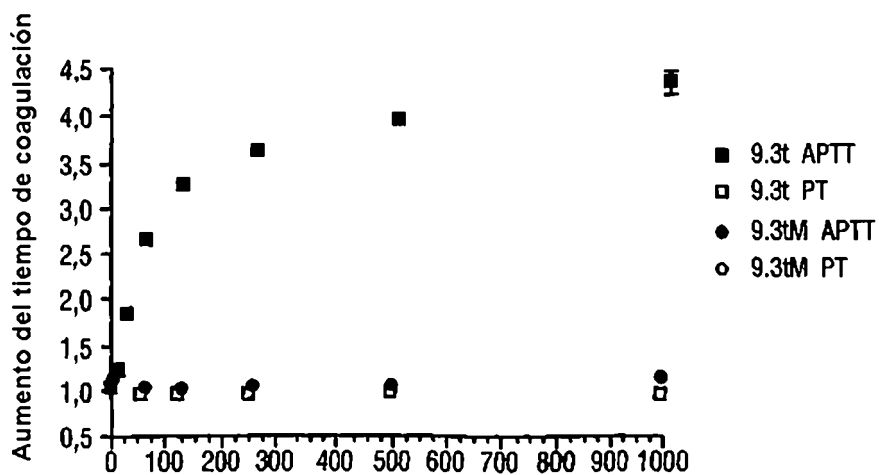


Fig. 2

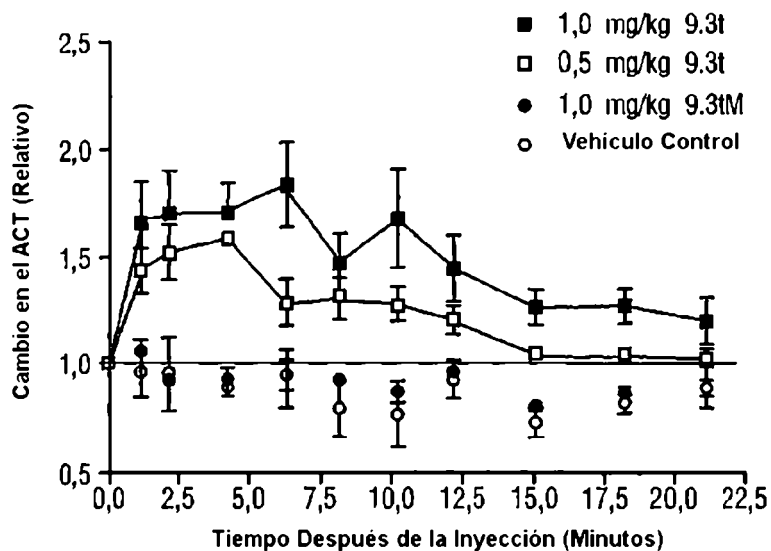


Fig. 3

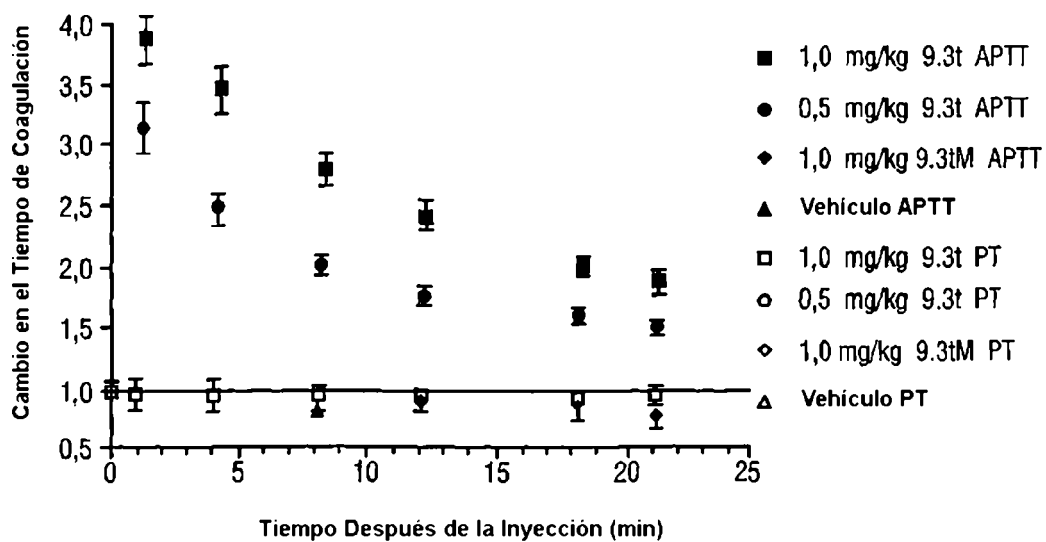


Fig. 4

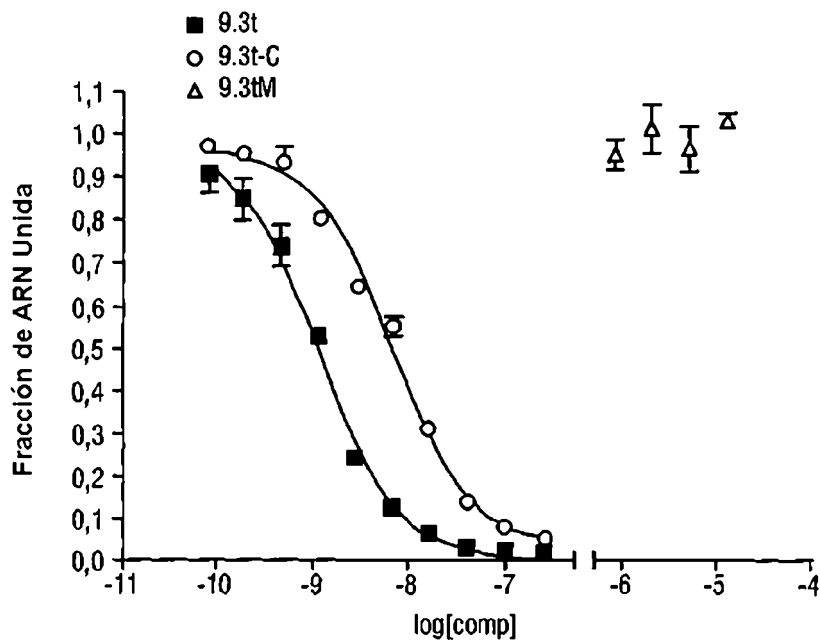


Fig. 5A

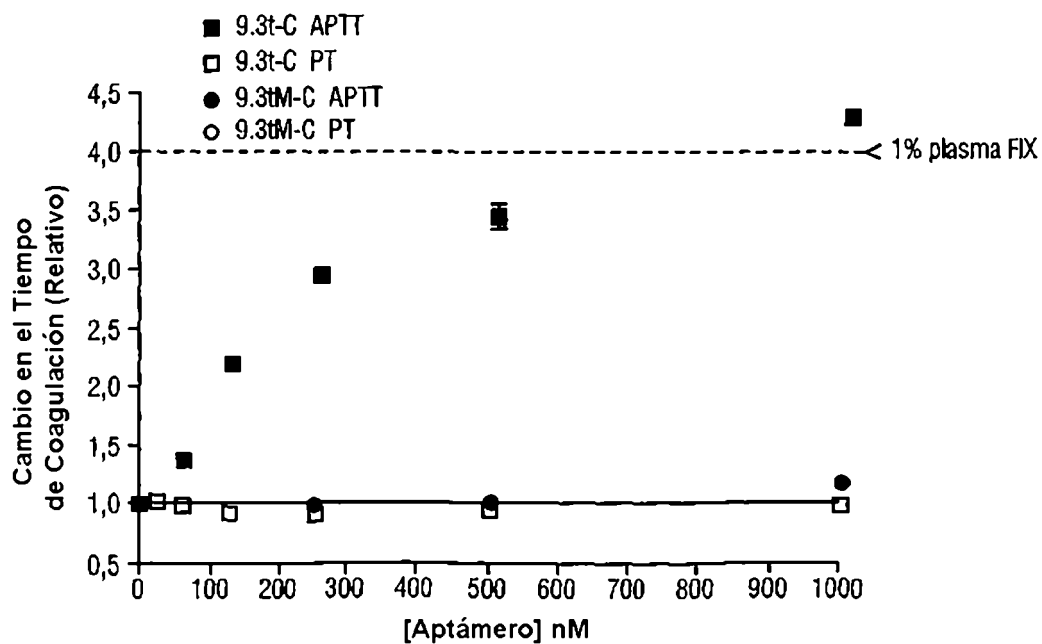


Fig. 5B

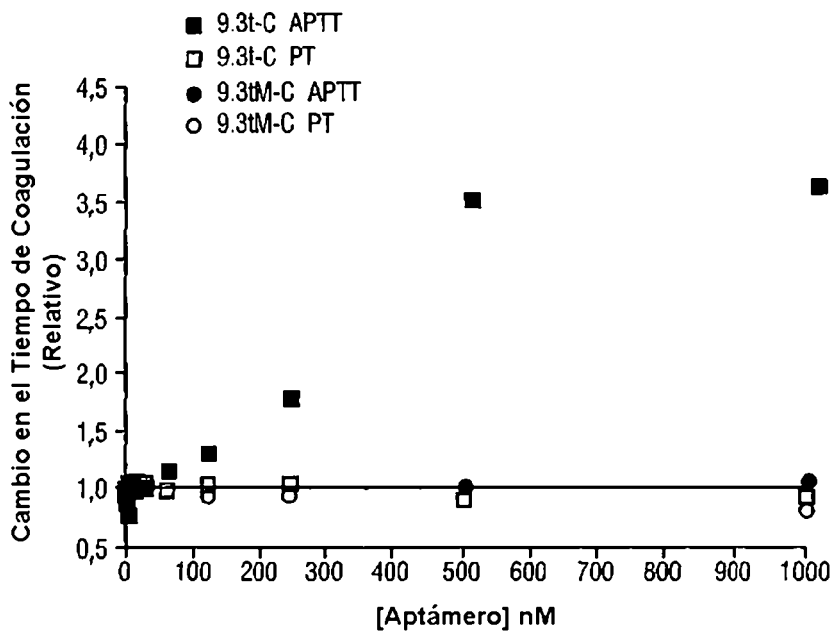


Fig. 5C

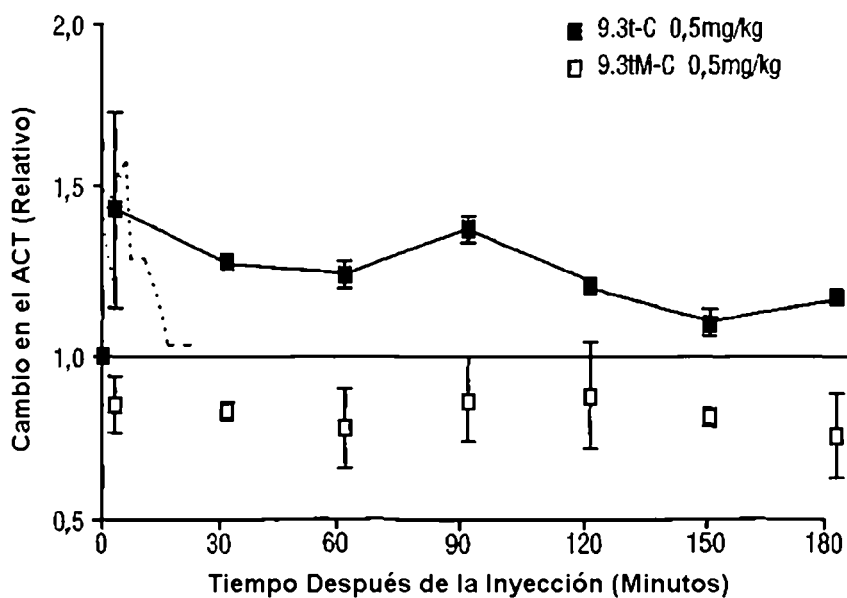


Fig. 6A

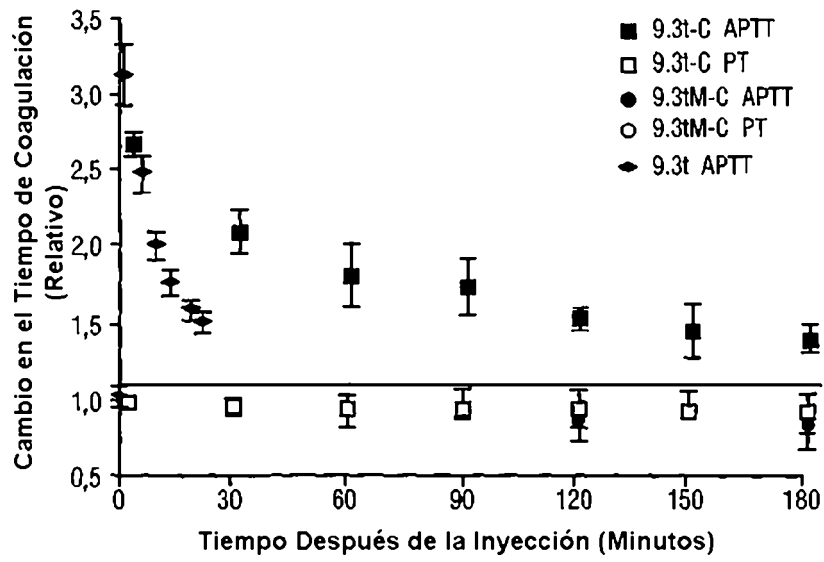


Fig. 6B

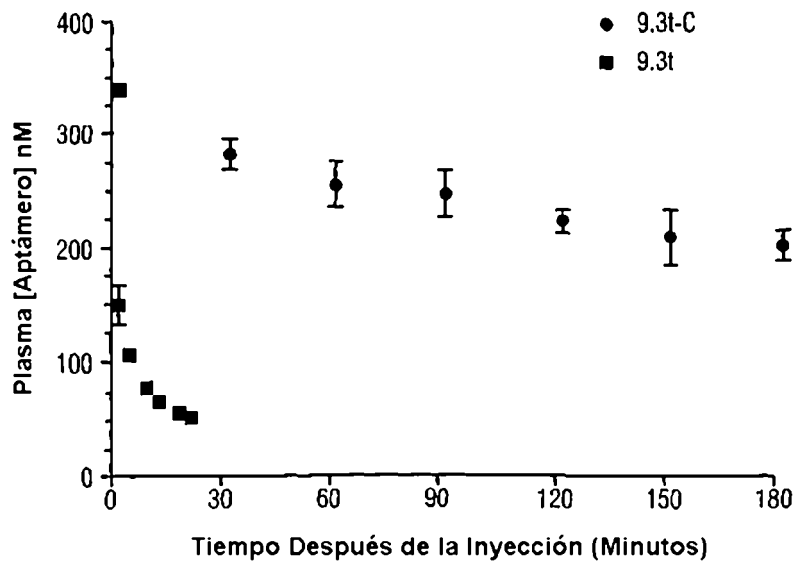


Fig. 6C

Aptámeros contra FIXa

	S1 →	L1	S2 →	L2	S2 ←	L3	S1 ←
9.3	ggggaugggGA	CUAUACC	GCG	UAAUGC	UGC	C	UCCCCAUUCC
9.20	gggGA	CUAUACCG	GCA	AUCG	UGC	A	UCCCC
9.19	ugggA	CCAUA	ACGA	CUAC	UCGU	GAA	UCCCCA
9.4	ugggCA	CUAUAC	GCA	UCU	UGC		UGCCUG
9.12	uggg	CGAUA	UAC	ACAUUG	GUG	AU	CCCA
9.17	gggA	CCAUAC	GCA	CAU	UGC	UGAA	UCCC
9.11	ugggA	CUAUA	UUCGG	AAU	CUGGA	C	UCCCCA
9.2	ggggauggg	CUAUUAUA	CAC	GCUG	GUG	AU	CCCAUCUC
9.7	gggauggg	CGAUA	ACCA	ACA	UGGU	GAU	CCCAUUC
9.16	uggg	CCAUA	CGU	GG	ACG	ACUGCA	CCCG
9.18	uggg	CCAUA	ACCA	CUU	UGGU	GAA	CCCA
9.28	gggCG	CCAUAC	GCA	CAU	UGC	UGCAU	CGCCU
9.25	ggGA	CCAUA	ACUC	UAAC	GGGU	GAA	UCCC
9.14	gggGA	CUAUA	CGU	GAACG	ACU	GCA	UCCAC
9.27	uggg	UAAUA	ACJ	GUA	UGG	UGAA	CCCA
9.26	ggg	UGAUA	ACCA	CUC	UGGU	GAA	CCC

Fig. 7

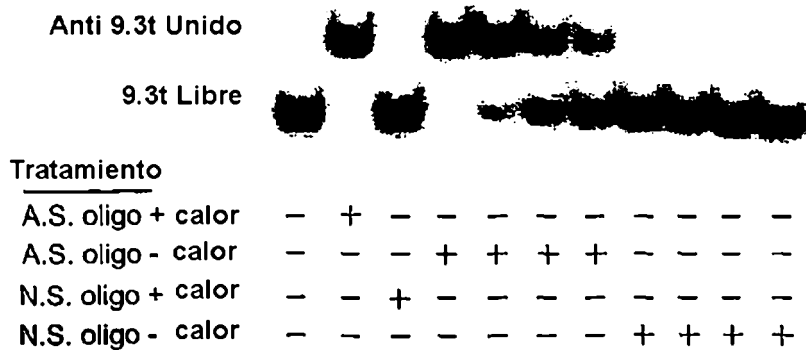


Fig. 8

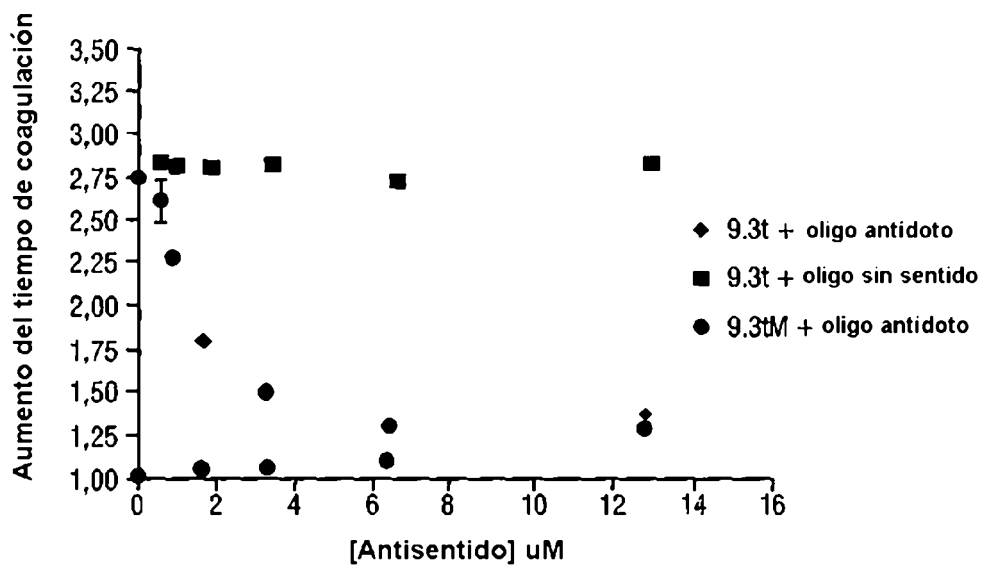


Fig. 9A

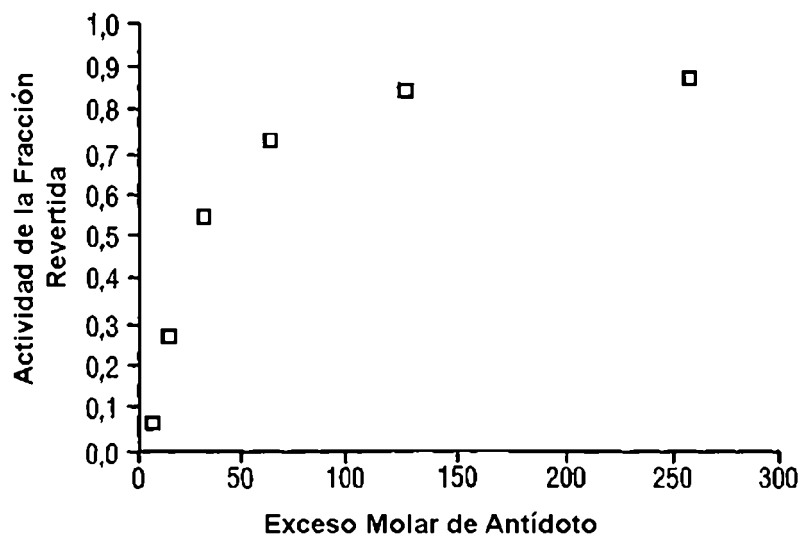


Fig. 9B

Fig. 10A

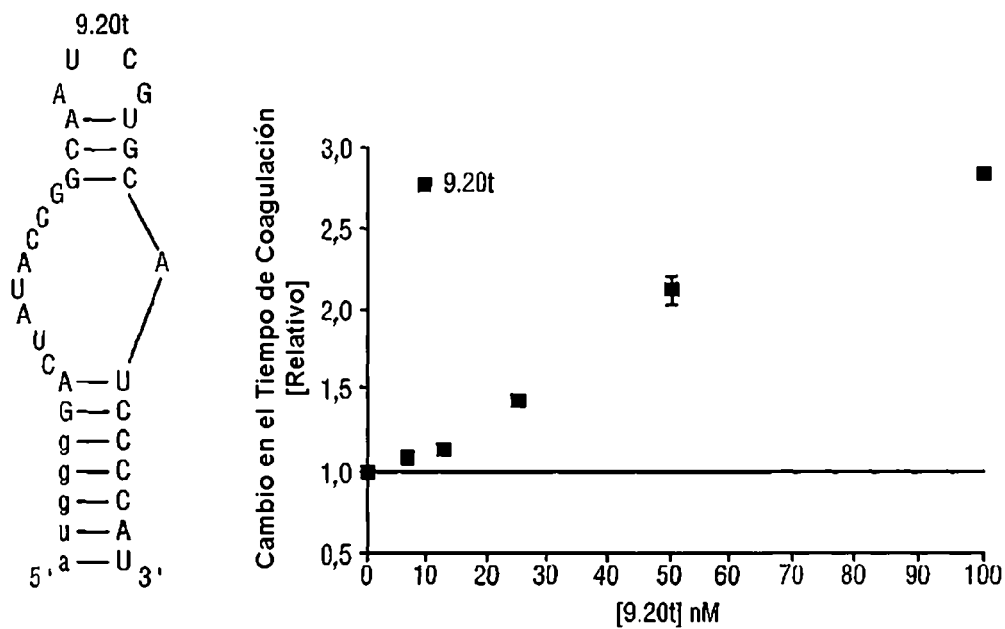


Fig. 10B

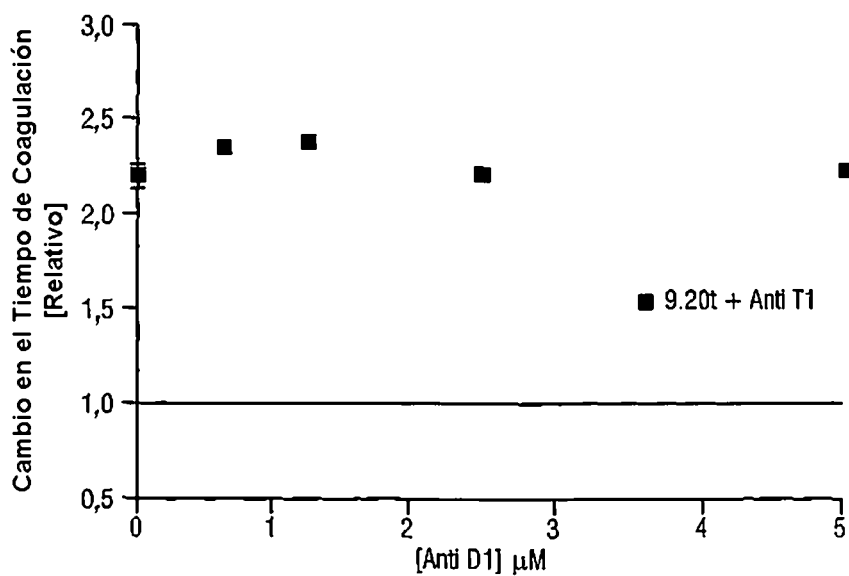
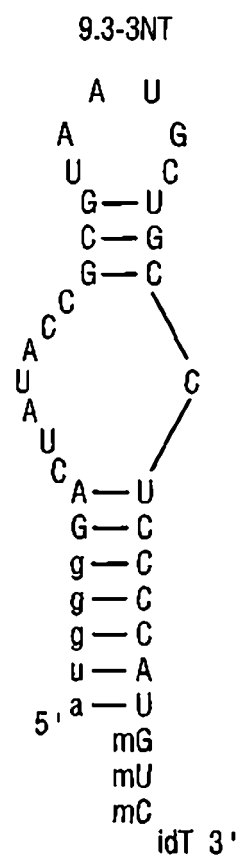


Fig. 10C



AS 3NT-1: 5' GAC AUG GGG AGG CAG CAU UA 3'  
 AS 3NT-2: 5' GAC AUG GGG AGG CAG CA 3'  
 AS 3NT-3: 5' GAC AUG GGG AGG CA 3'

Fig. 11

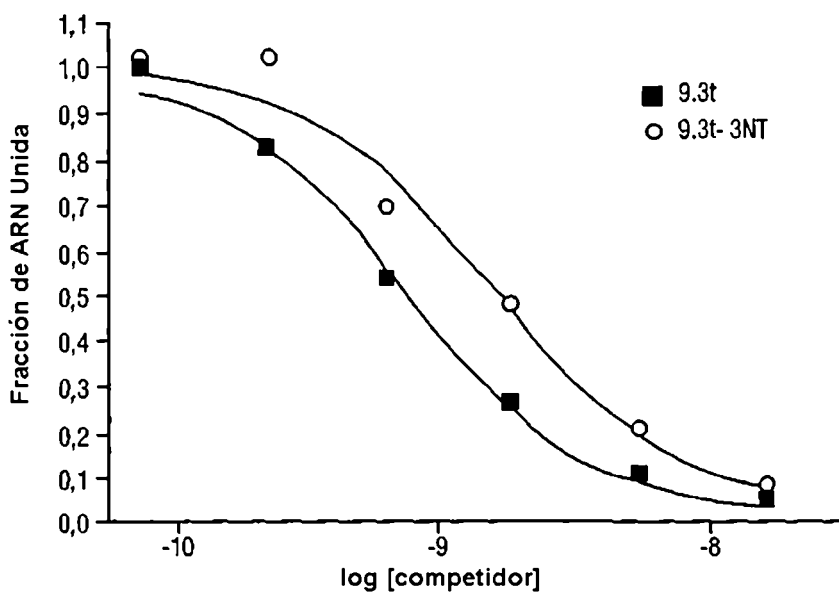


Fig. 12A

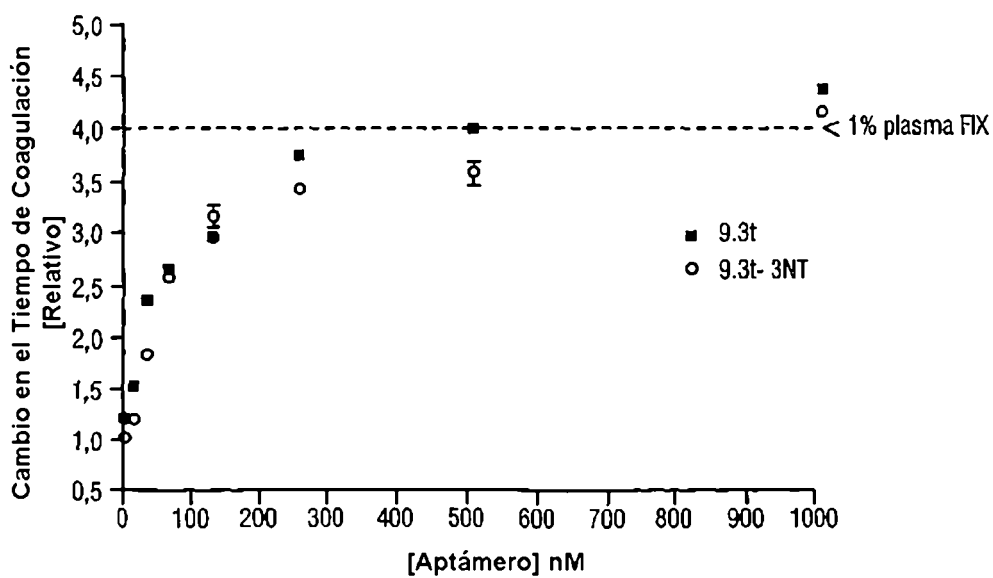


Fig. 12B

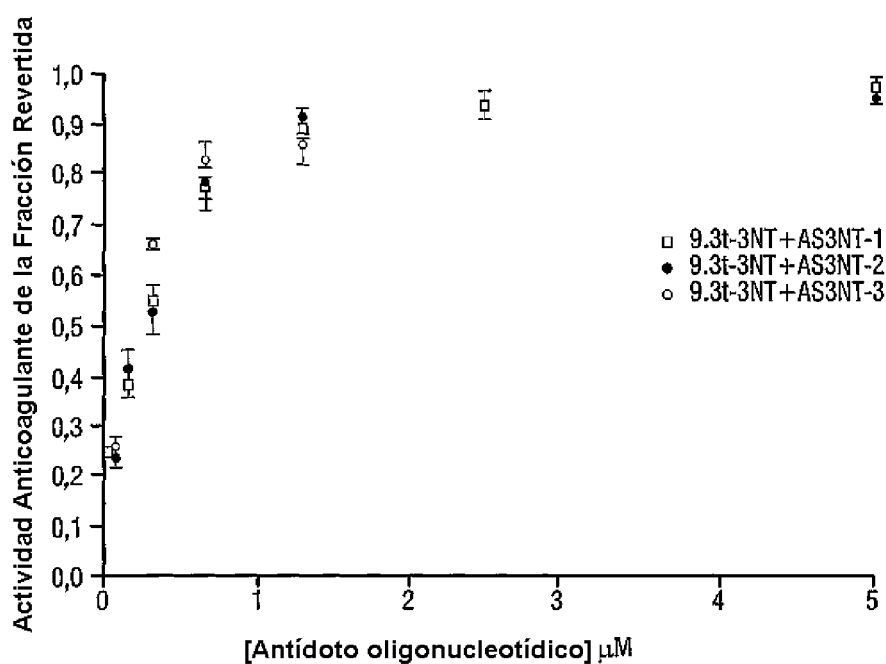


Fig. 13A

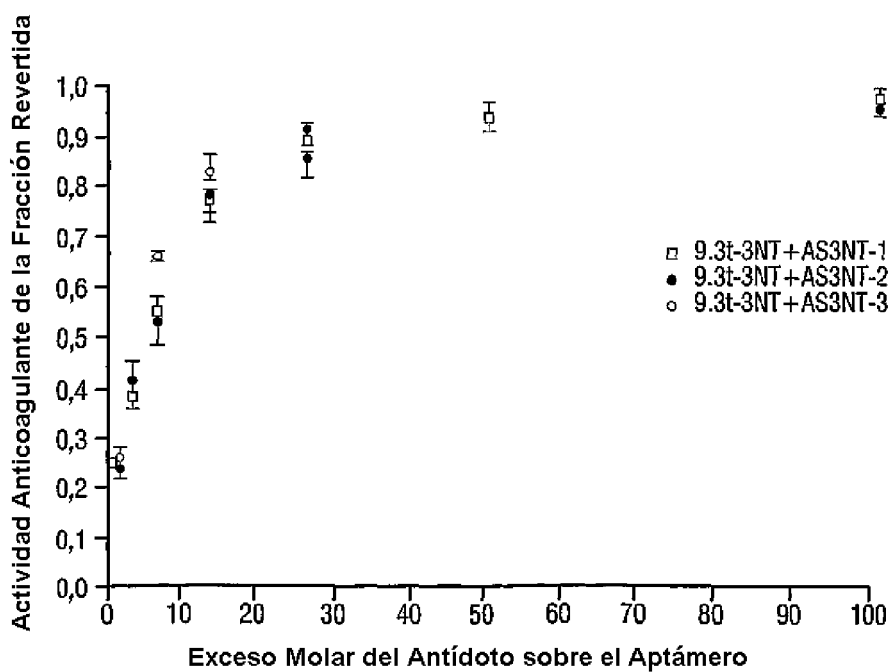


Fig. 13B

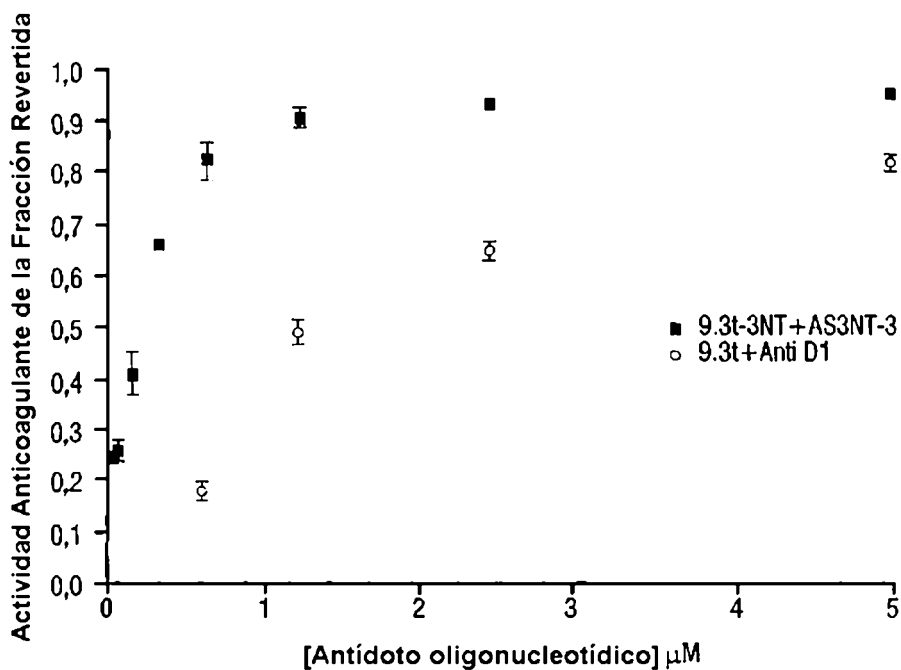


Fig. 14A

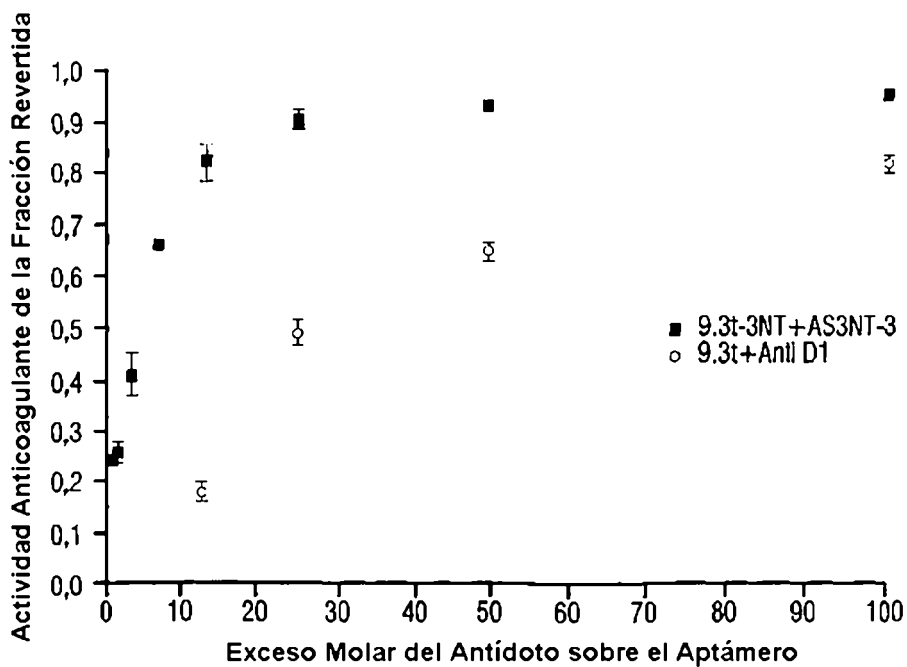


Fig. 14B

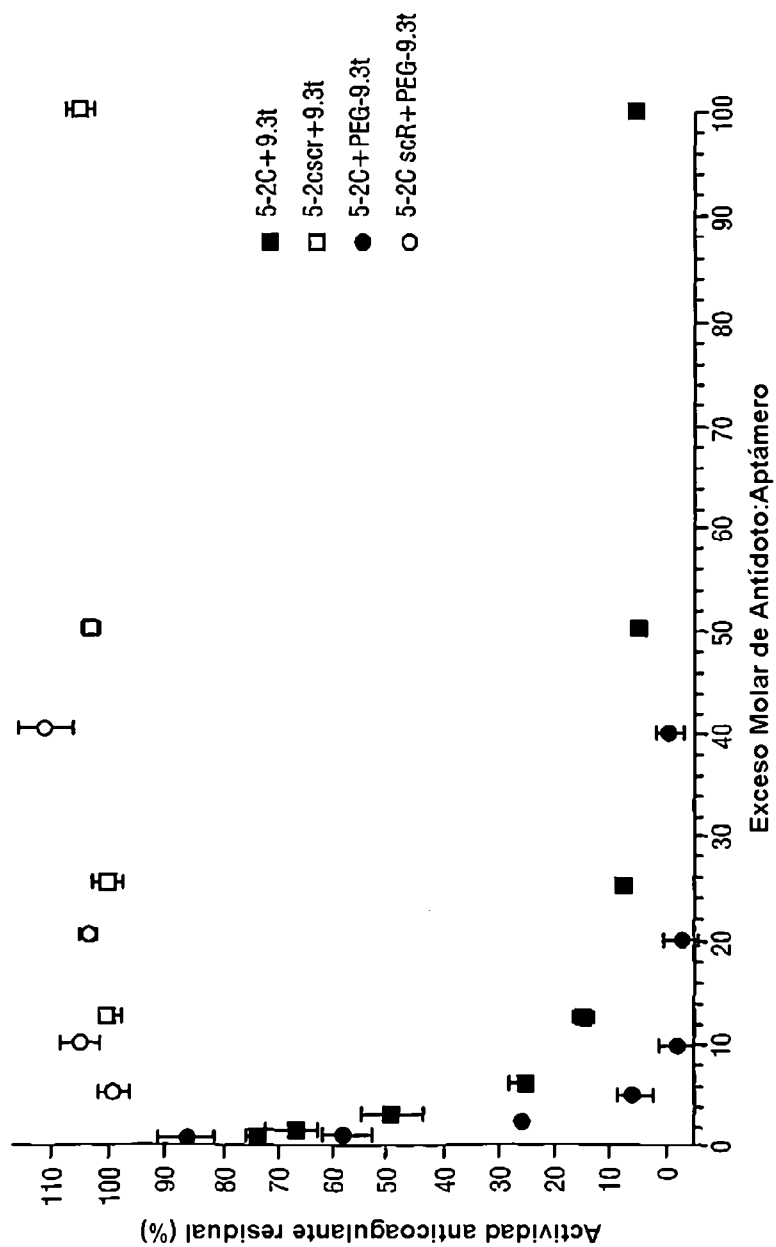


Fig. 15

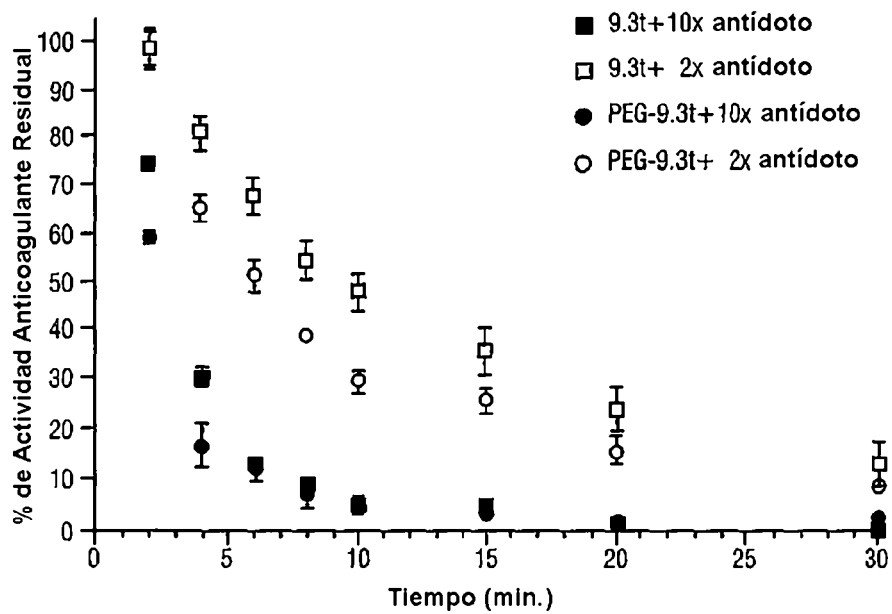


Fig. 16

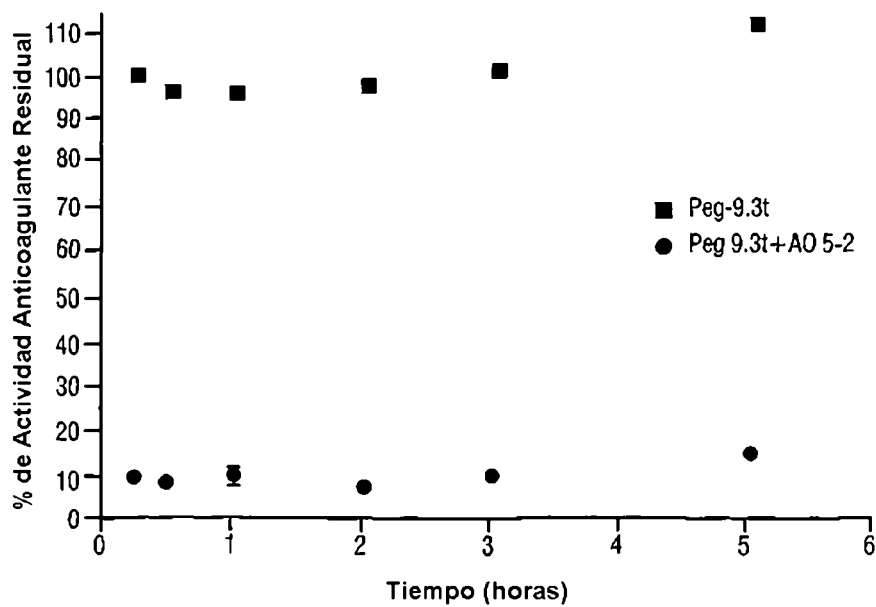


Fig. 17

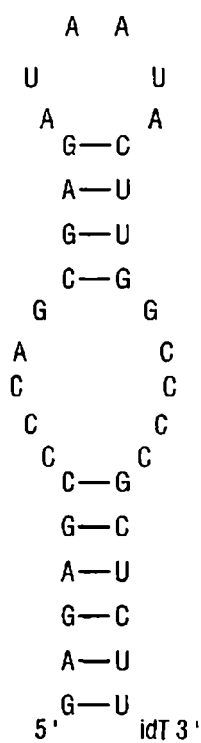


Fig. 18A

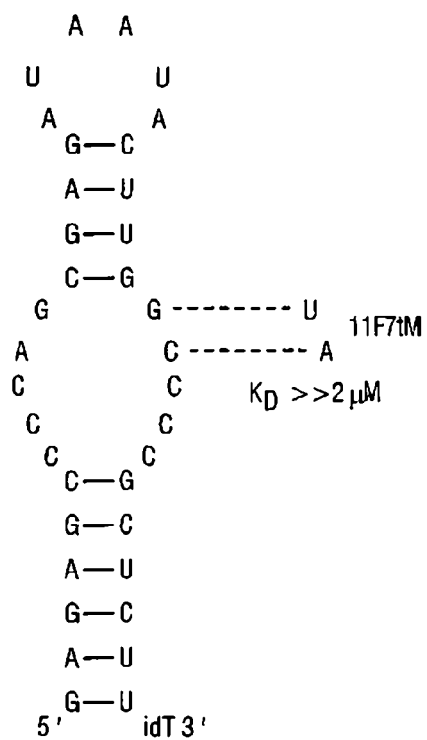


Fig. 18B

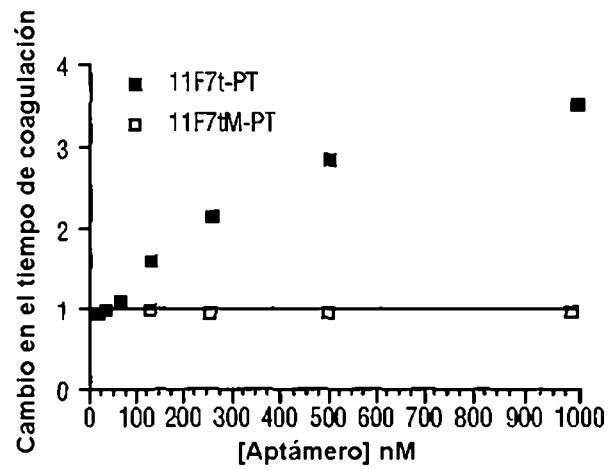


Fig. 19A

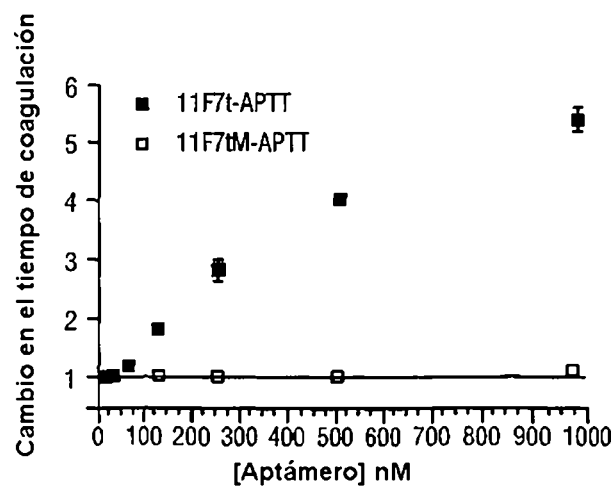
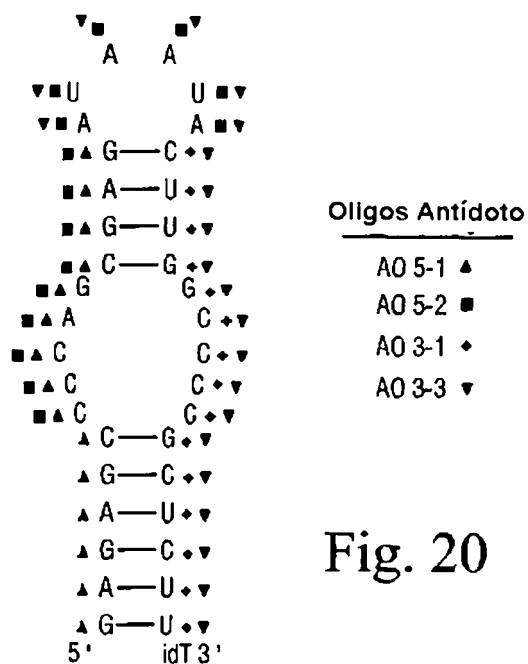


Fig. 19B



Oligos Antídoto

- AO 5-1 ▲
- AO 5-2 ■
- AO 3-1 ◆
- AO 3-3 ▼

Fig. 20

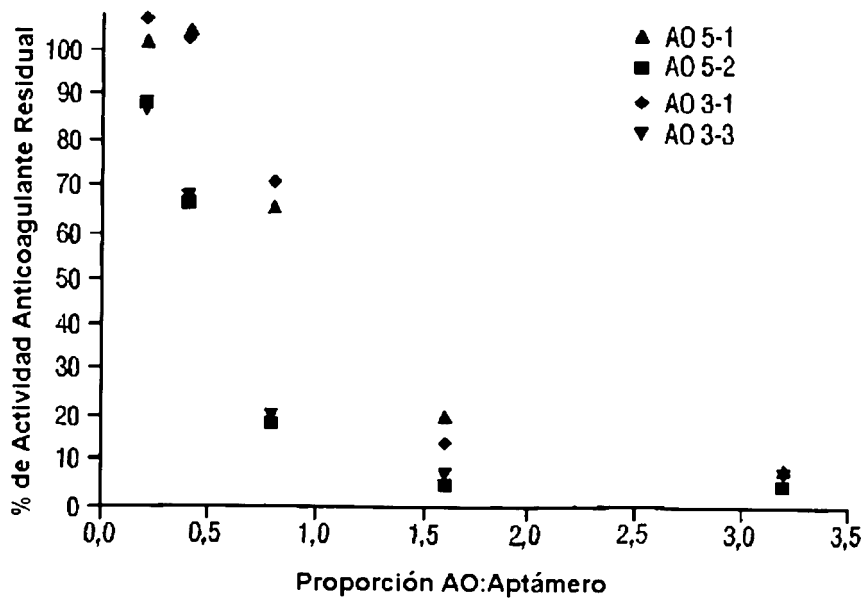


Fig. 21A

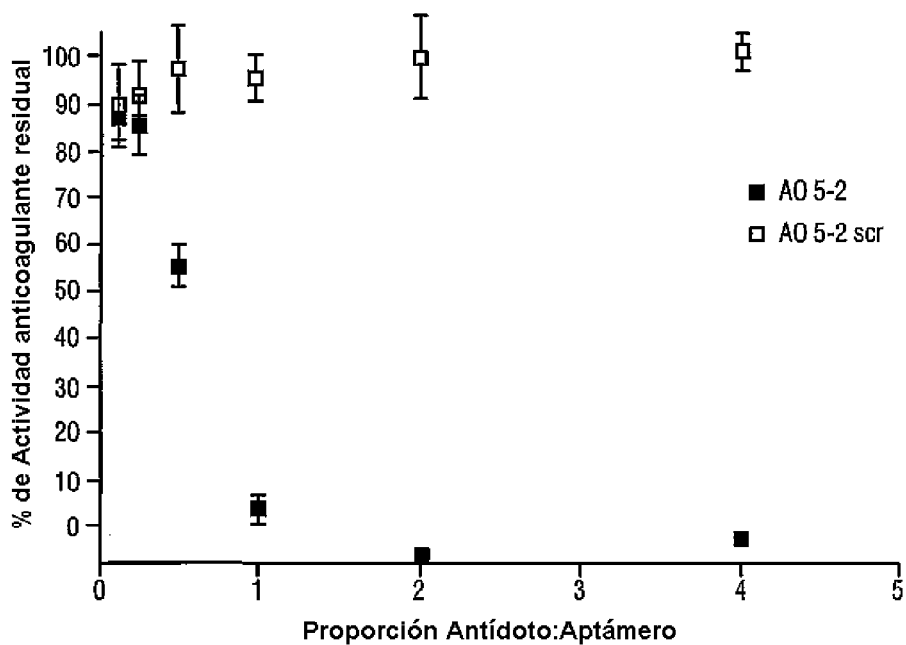


Fig. 21B

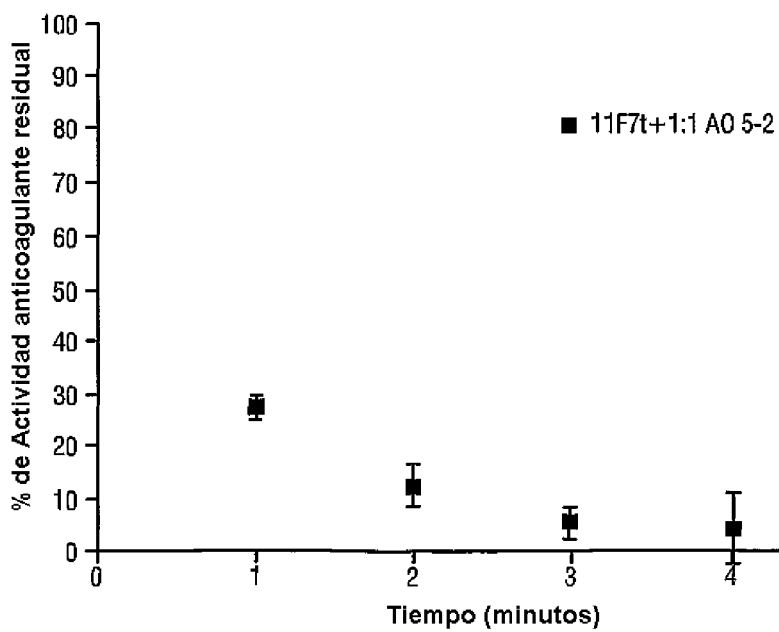


Fig. 22

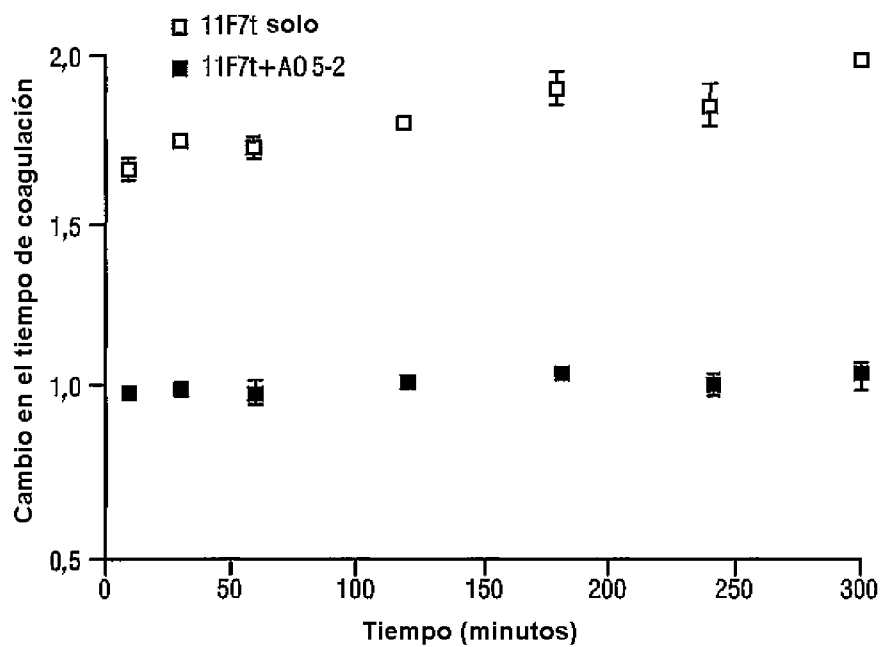


Fig. 23

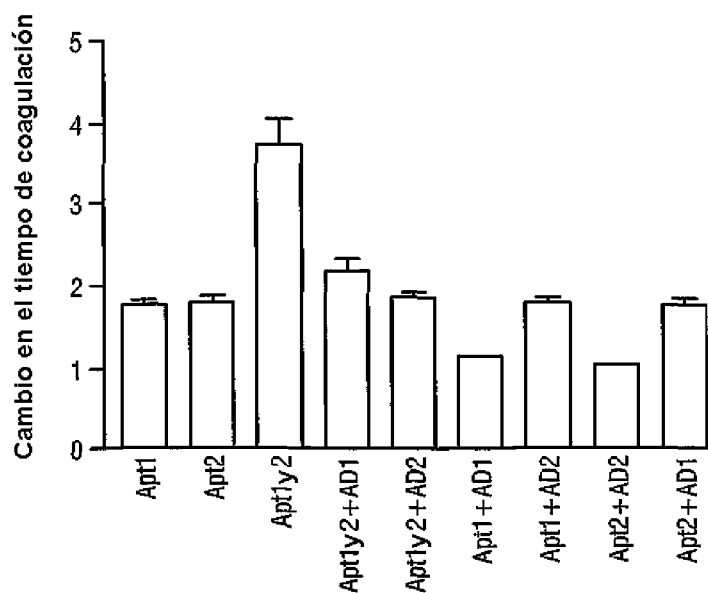


Fig. 24

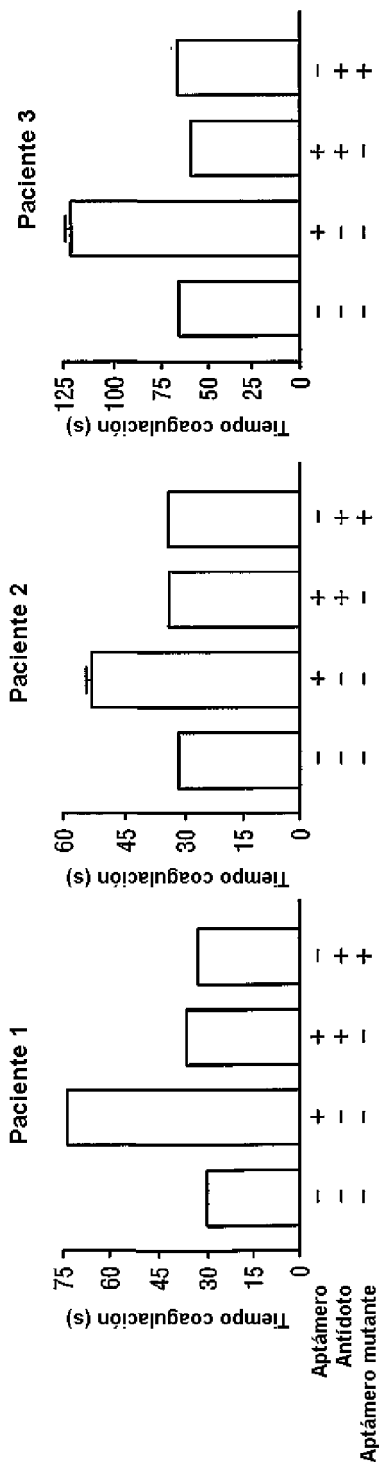


Fig. 25C

Fig. 25B

Fig. 25A

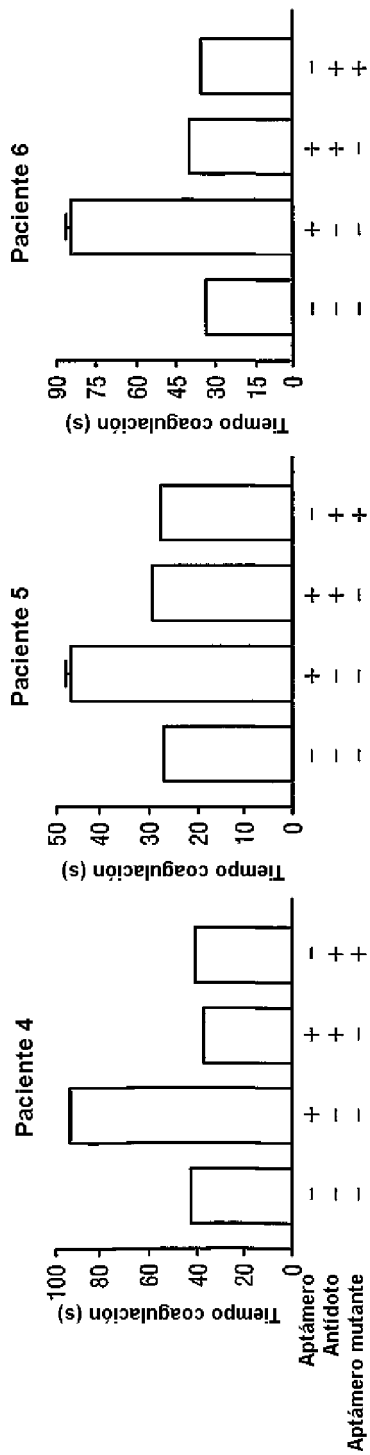


Fig. 25F

Fig. 25E

FIG 25D

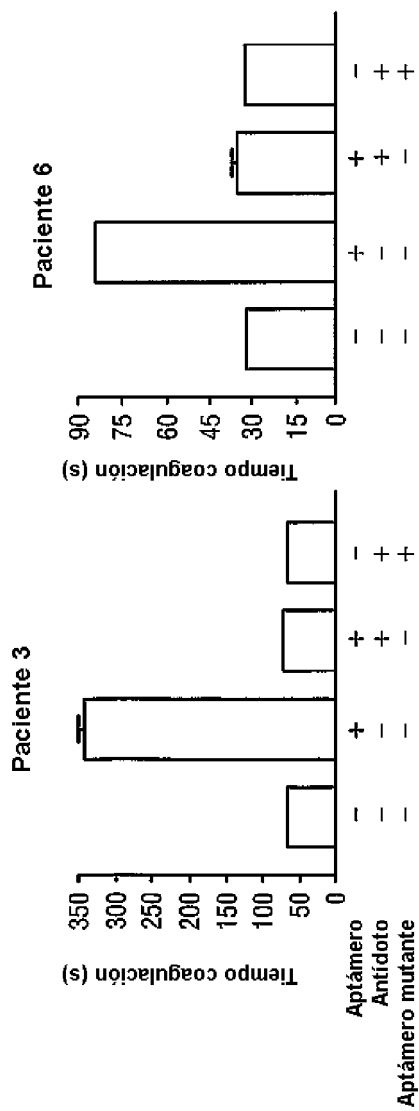


Fig. 26A

Fig. 26B