

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.03.08	(73) Titular(es): ARCHEMIX LLC 601 MONTGOMERY STREET, SUITE 2020 SAN FRANCISCO, CA 94111 US
(30) Prioridade(s): 2006.03.08 US 780905 P 2006.09.29 US 848274 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2013.05.29	(72) Inventor(es): DAVID EPSTEIN US JEFFREY C. KURZ US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.12.16 055/2016	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **APTÂMEROS DE LIGAÇÃO AO COMPLEMENTO E AGENTES ANTI-C5 ÚTEIS NO TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS OCULARES**

(57) Resumo:

SÃO DESCRITOS MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS OCULARES MEDIADOS PELO COMPLEMENTO POR MEIO DA ADMINISTRAÇÃO DE AGENTES QUE INIBEM O COMPONENTE DO COMPLEMENTO DE UM INDIVÍDUO NUMA QUANTIDADE SUFICIENTE PARA TRATAR O DISTÚRBO OCULAR EM QUE, NUMA FORMA DE REALIZAÇÃO SELECIONADA, O DITO AGENTE É UM APTÂMERO ANTI-COMPLEMENTO QUE, NUMA FORMA DE REALIZAÇÃO PREFERIDA, É UM APTÂMERO ANTI-C5.

RESUMO

**APTÂMEROS DE LIGAÇÃO AO COMPLEMENTO E AGENTES ANTI-C5 ÚTEIS
NO TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS OCULARES**

São descritos métodos de tratamento de distúrbios oculares mediados pelo complemento por meio da administração de agentes que inibem o componente do complemento de um indivíduo numa quantidade suficiente para tratar o distúrbio ocular em que, numa forma de realização selecionada, o dito agente é um aptâmero anti-complemento que, numa forma de realização preferida, é um aptâmero anti-C5.

DESCRIÇÃO

APTÂMEROS DE LIGAÇÃO AO COMPLEMENTO E AGENTES ANTI-C5 ÚTEIS NO TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS OCULARES

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção, em geral, refere-se ao campo de ácidos nucleicos e mais particularmente a aptâmeros capazes de ligar às proteínas do sistema complemento, úteis como agentes terapêuticos e no diagnóstico de distúrbios ou doenças oftálmicas relacionadas com o complemento em que, especialmente, a ativação do complemento mediada por C5 foi implicada. Em formas de realização preferidas, a invenção refere-se mais especificamente a métodos e materiais para o tratamento de DMRI de tipo não exsudativo e detecção de DMRI de tipo não exsudativo. A divulgação refere-se ainda a materiais e métodos para a administração de aptâmeros capazes de ligar a proteínas do sistema complemento incluindo proteínas C5.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Um aptâmero, por definição, é uma molécula isolada de ácido nucleico que liga com alta especificidade e afinidade a algum alvo, tal como uma proteína por meio de interações diferentes do emparelhamento de base de Watson-Crick. Embora os aptâmeros sejam moléculas à base de ácido nucleico, há uma diferença fundamental entre aptâmeros e outras moléculas de ácido nucleico, tais como genes e ARNm. Nos últimos, a estrutura de ácido nucleico codifica informação por meio de a sua sequência de bases linear e consequentemente esta sequência é de importância para a função de armazenamento de informação. Completamente ao contrário, a função do aptâmero, que é baseada na ligação específica de uma molécula alvo, não depende de uma sequência conservada de bases linear, mas de em vez disso uma estrutura secundária/terciária particular. Isto é, os

aptâmeros são sequências não codificantes. Qualquer potencial de codificação que um aptâmero possa possuir é completamente fortuita e não exerce qualquer papel na ligação de um aptâmero ao seu alvo cognato. Conseqüentemente, embora possa ocorrer que os aptâmeros que ligam ao mesmo alvo, e mesmo ao mesmo sítio nesse alvo, partilhem uma sequência de bases lineares similares, a maioria não o faz.

Os aptâmeros também devem ser diferenciados das sequências de ácidos nucleicos de ocorrência natural que ligam a certas proteínas. Estas últimas sequências são sequências de ocorrência natural incorporadas no genoma do organismo que liga a um subgrupo especializado de proteínas que estão envolvidas na transcrição, tradução e transporte de ácidos nucleicos de ocorrência natural, isto é, proteínas de ligação a ácidos nucleicos. Os aptâmeros, por outro lado, são moléculas de ácidos nucleicos curtas, isoladas, que não são de ocorrência natural. Enquanto possam ser identificados aptâmeros que ligam a proteínas de ligação a ácidos nucleicos, na maioria dos casos, tais aptâmeros têm pouca ou nenhuma identidade de sequência com as sequências reconhecidas por parte de proteínas de ligação a ácidos nucleicos na natureza. De maneira mais importante, os aptâmeros podem ligar a praticamente qualquer proteína (não somente às proteínas que ligam a ácidos nucleicos), bem como quase qualquer alvo de interesse, incluindo moléculas pequenas, hidratos de carbono, péptidos, etc. Para a maioria dos alvos, mesmo proteínas, uma sequência de ácidos nucleicos de ocorrência natural à qual estes ligam não existe; para os alvos que têm uma tal sequência, isto é, proteínas de ligação a ácidos nucleicos, tais sequências diferirão dos aptâmeros como um resultado da afinidade de ligação relativamente baixa usada na natureza em comparação com os aptâmeros que ligam fortemente.

Os aptâmeros, tal como péptidos gerados através de apresentação em fagos ou anticorpos, são capazes de ligar especificamente a alvos selecionados e modular a atividade ou interações de ligação do alvo, por exemplo, por meio de aptâmeros de ligação podem bloquear a capacidade de funcionamento do seu alvo. Tal como com anticorpos, esta propriedade funcional de ligação específica a um alvo é uma propriedade inerente. Também como com anticorpos, embora um perito na especialidade possa não saber que características estruturais exatas terá um aptâmero para um alvo, o perito na especialidade sabe como identificar, fabricar e utilizar uma tal molécula na ausência de uma definição estrutural exata.

Os aptâmeros também são análogos a agentes terapêuticos de molécula pequena em que uma única alteração estrutural, embora aparentemente menor, pode afetar dramaticamente (em várias ordens de magnitude) a ligação e/ou outra atividade (ou atividades) do aptâmero. Por outro lado, algumas alterações estruturais terão pouco ou nenhum efeito. Isto resulta da importância da estrutura secundária/terciária de aptâmeros. Noutras palavras, um aptâmero é uma estrutura tridimensional mantida numa conformação fixa que proporciona contatos químicos para ligar especificamente ao seu dado alvo. Consequentemente: (1) algumas áreas ou sequências particulares são essenciais como (a) pontos específicos de contato com alvo, e/ou como (b) sequências que posicionam as moléculas em contato com o alvo; (2) algumas áreas ou sequências particulares têm um intervalo de variabilidade, por exemplo, o nucleótido X deve ser uma pirimidina, ou o nucleótido Y deve ser uma purina, ou os nucleótidos X e Y devem ser complementares; e (3) algumas áreas ou sequências particulares podem ser qualquer coisa, isto é, são essencialmente elementos de espaçamento, por exemplo, podem ser qualquer cadeia de nucleótidos de um dado comprimento ou mesmo um espaçador

não nucleótido, tal como uma molécula de PEG.

Descobertos através de um processo de seleção *in vitro* dos conjuntos de oligonucleótidos de sequência aleatória, os aptâmeros foram gerados para mais de 130 proteínas, incluindo fatores de crescimento, fatores de transcrição, enzimas, imunoglobulinas, e recetores. Um aptâmero típico tem 10-15 kDa de tamanho (20-45 nucleótidos), liga ao seu alvo com afinidade nanomolar a subnanomolar, e discrimina contra alvos intimamente relacionados (por exemplo, os aptâmeros tipicamente não ligarão a outras proteínas da mesma família génica). Uma série de estudos estruturais mostrou que os aptâmeros são capazes de utilizar os mesmos tipos de interações de ligação (por exemplo, ligação de hidrogénio, complementaridades eletrostáticas, contatos hidrofóbicos, exclusão estérica) que conduzem a afinidade e especificidade em complexos anticorpo-antigénio.

Os aptâmeros têm uma série de características desejáveis para utilização como agentes terapêuticos e de diagnóstico incluindo alta especificidade e afinidade, eficácia biológica, e excelentes propriedades farmacocinéticas. Além disso, oferecem vantagens competitivas específicas sobre anticorpos e outras proteínas biológicas, por exemplo:

1) Velocidade e controlo. Os aptâmeros são produzidos através de um processo completamente *in vitro*, permitindo a rápida geração de condutores iniciais, incluindo condutores terapêuticos. A seleção *in vitro* permite que a especificidade e afinidade do aptâmero sejam estreitamente controladas e permite a geração de condutores, incluindo condutores contra alvos tanto tóxicos como não imunogénicos.

2) Toxicidade e Imunogenicidade. Os aptâmeros como uma classe demonstraram toxicidade terapêuticamente aceitável e falta de imunogenicidade. Enquanto a eficácia de vários anticorpos monoclonais pode ser gravemente limitada por

parte da resposta imune a anticorpos em si, é extremamente difícil provocar anticorpos para aptâmeros provavelmente devido a que os aptâmeros não podem ser apresentados por parte de células T por meio do MHC e a resposta imune é geralmente treinada para não reconhecer fragmentos de ácido nucleico.

3) Administração. Enquanto a maioria dos anticorpos terapêuticos atualmente aprovados é administrada através de infusão intravenosa (tipicamente durante 2-4 horas), os aptâmeros podem ser administrados através de injeção subcutânea (a biodisponibilidade do aptâmero por meio de administração subcutânea é > 80 % em estudos em macacos (Tucker *et al.*, J. Chromatography B. 732: 203-212, 1999)). Esta diferença é principalmente devida à solubilidade comparativamente baixa e conseqüentemente grandes volumes necessários para a maioria dos mAbs terapêuticos. Com boa solubilidade (> 150 mg/ml) e massa molecular comparativamente baixa (aptâmero: 10-50 kDa; anticorpo: 150 kDa), uma dose semanal de aptâmero pode ser distribuída através de injeção num volume menor do que 0,5 ml. Além disso, o tamanho pequeno dos aptâmeros permite que penetrem nas áreas de restrições conformacionais que não permitem que anticorpos ou fragmentos de anticorpo penetrem, apresentando ainda outra vantagem de terapêuticos ou profilaxia à base de aptâmeros.

4) Escalabilidade e custo. Os aptâmeros terapêuticos são sintetizados quimicamente e conseqüentemente podem ser prontamente dimensionados conforme necessário para alcançar a demanda de produção. Enquanto dificuldades na produção de dimensionamento estejam atualmente a limitar a disponibilidade de alguns produtos biológicos e o custo capital de uma fábrica de produção de proteína a grande escala é enorme, um único sintetizador de oligonucleótido a grande escala pode produzir por cima de 100 kg/ano e requer um investimento inicial relativamente modesto. O custo

atual de bens para síntese de aptâmeros na escala de quilogramas é estimado em \$500/g, comparável àquele para anticorpos altamente otimizados. É esperado que melhorias contínuas no desenvolvimento do processo diminuam o custo de bens para < 100\$/g em cinco anos.

5) Estabilidade. Os aptâmeros terapêuticos são quimicamente robustos. Estão intrinsecamente adaptados para recuperar atividade após exposição a fatores tais como calor e desnaturantes e podem ser armazenados durante períodos prolongados (> 1 ano) à temperatura ambiente como pós liofilizados. Em contraste, os anticorpos devem ser armazenados refrigerados.

Sistema complemento. O sistema complemento compreende um conjunto de pelo menos 20-30 proteínas de plasma e de membrana que atuam juntas num sistema de cascata regulado para atacar formas extracelulares de agentes patogénicos (por exemplo, bactérias). O sistema complemento inclui três cascatas de ativação enzimáticas diferentes, as vias clássica, de lectina e alternativa (Figura 1) que convergem na ativação de C5 e resultam numa via não enzimática conhecida como a via de ataque da membrana.

A primeira cascata ativada enzimaticamente, conhecida como a via clássica, compreende vários componentes, C1, C4, C2, C3 e C5 (listados por ordem na via). A iniciação da via clássica do sistema complemento ocorre após ligação e ativação do primeiro componente do complemento (C1) por parte de ativadores tanto imunes como não imunes. C1 compreende um complexo dependente de cálcio de componentes Clq,Clr e Cls, e é ativado por meio da ligação do componente Clq. Clq contém seis subunidades idênticas e cada subunidade compreende três cadeias (as cadeias A, B e C). Cada cadeia tem uma região de cabeça globular que se encontra ligada a uma cauda semelhante a colagénio. A ligação e ativação de Clq por parte de complexos antigénio-anticorpo ocorrem por meio da região do grupo da cabeça de

Clq. Numerosos ativadores Clq não de anticorpo, incluindo proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, ligam e ativam Clq por meio de um sítio distinto na região de haste semelhante a colagénio. O reconhecimento molecular dos ativadores do complemento por parte de Clq induz uma alteração da conformação que estimula a autoativação da proenzima C1r que, por sua vez, catalisa a ativação proteolítica de C1s. C1s catalisa então a ativação dos componentes do complemento C4 e C2, formando o complexo C4bC2a que funciona como uma convertase de C3.

A segunda cascata ativada enzimaticamente, conhecida como a via de lecitina, é semelhante à primeira, exceto que o complexo MBL/MASP-2 toma o lugar do C1. A lecitina de ligação a manano (MBL) reconhece diretamente polissacarídeos contendo manose nas superfícies de bactérias e é estrutural e funcionalmente homóloga ao componente Clq de C1. A ligação de MBL ao ativador induz a ativação de protease 2 associada a MBL (MASP-2). MASP-2, por sua vez, catalisa a ativação de C4 e C2 de uma maneira homóloga à função de C1s, levando à formação da convertase de C3.

A terceira cascata ativada enzimaticamente, conhecida como a via alternativa, é uma via rápida, independente de anticorpo para ativação e amplificação do sistema complemento. A via alternativa compreende vários componentes, C3, Fator B, e Fator D (listados por ordem na via). A ativação da via alternativa ocorre quando C3b, uma forma de clivagem proteolítica de C3, é ligada a um agente de superfície de ativação, tal como uma bactéria. O Fator B é então ligado a C3b, e clivado por parte do Fator D para produzir a convertase de C3 C3bBb. A amplificação da atividade de convertase de C3 ocorre à medida que C3b adicional é produzida e depositada. A resposta de amplificação é adicionalmente auxiliada por parte da ligação da proteína reguladora positiva properdina (P), que

estabiliza a convertase ativa contra a degradação, estendendo a sua semivida de 1-2 minutos a 18 minutos.

Consequentemente, todas as três vias produzem convertases de C3 que dividem o fator C3 em C3a e C3b. Neste ponto, ambas convertases de C3 (clássica/lectina e alternativa) são adicionalmente montadas em convertases de C5 (C4b2a3b e C3b3bBb). Estes complexos clivam subsequentemente o componente do complemento C5 em dois componentes: o polipéptido C5a (9 kDa) e o polipéptido C5b (170 kDa). O polipéptido C5a liga a um recetor acoplado à proteína G de transmembrana 7, que se encontrava originalmente associado com leucócitos e é agora conhecido como sendo expresso numa variedade de tecidos incluindo hepatócitos e neurónios. A molécula C5a é o componente quimiotático principal do sistema complemento humano e pode disparar uma variedade de respostas biológicas incluindo quimiotaxia de leucócitos, contração de músculo liso, ativação de vias de transdução de sinal intracelular, adesão neutrófilo-endotelial, libertação de mediador de citocinas e lípidos e formação de oxidante.

O fragmento maior de C5b liga sequencialmente a componentes posteriores da cascata do complemento, C6, C7, C8 e C9 para formar o complexo de ataque à membrana ("MAC") C5b-9. O MAC C5b-9 pode lisar diretamente os eritrócitos e, em maiores quantidades, é lítico para leucócitos e nocivo para tecidos tais como células musculares, epiteliais e endoteliais. Em quantidades sublíticas, o MAC pode estimular a regulação positiva de moléculas de adesão, aumento de cálcio intracelular e libertação de citocinas. Além disso, o MAC C5b-9 pode estimular células tais como células endoteliais e plaquetas sem causar lise celular. Os efeitos não líticos de C5a e o C5b-9 MAC são algumas vezes muito semelhantes.

Embora o sistema complemento tenha um importante papel na manutenção da saúde, tem potencial para causar ou

contribuir a doenças. Por exemplo, o sistema complemento foi implicado em efeitos secundários relacionados com a cirurgia de enxerto de *bypass* da artéria coronária ("CABG"), numerosas doenças e/ou condições renais, reumatológicas, neurológicas, dermatológicas, hematológicas, vasculares/pulmonares, alérgicas, infecciosas e de biocompatibilidade/choque. O sistema complemento não é necessariamente a única causa de um estado de doença, mas pode ser um de vários fatores que contribuem para a patogénese.

Recentemente, os dados sugerem que o complemento também está implicado na doença ocular. Desta maneira, seria benéfico ter novos inibidores do sistema complemento para utilização como agentes terapêuticos e de diagnóstico no tratamento de distúrbios oculares relacionados com o complemento.

Avery *et al* (Ophthalmology 2006; 113:363-372) relataram que a segurança a curto prazo, efeito biológico, e possível mecanismo de ação do bevacizumab intravítreo em pacientes com degeneração macular relacionada com a idade (DMRI) neovascular.

Heier (Ophthalmology 2006; 113:633-642) avaliou a segurança de injeções intravítreas repetidas de ranibizumab no tratamento de degeneração macular relacionada com a idade (DMRI) neovascular, e avaliou alterações da atividade visual (VA) e características da lesão por DMRI.

Nozaki *et al.* (Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularisation, PNAS (2006) 103(7): 2328-2333) descrevem evidências de que fragmentos bioativos dos componentes do complemento C3a e C5a estão presentes em drusas de pacientes com DMRI, e que C3a e C5a induzem a expressão de VEGF *in vitro* e *in vivo*.

Bora *et al.* (Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularisation, The Journal of Immunology (2005)

174:491-497) descrevem a deposição de C3 e do complexo de ataque à membrana no complexo neovascular num modelo de ratinho de CNV induzido por *laser*. Relatam que um anticorpo C6 anti-ratinho inibiu a formação de MAC e teve como resultado a inibição de CNV.

O documento WO 2005/079363 descreve o aptâmero anti-C5 ARC1905.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma ilustração representando as vias clássica e alternativa do sistema complemento.

A Figura 2 é uma representação esquemática do processo de seleção de aptâmero *in vitro* (SELEX™) dos conjuntos de oligonucleótidos de sequência aleatória.

A Figura 3A é uma ilustração representando a sequência de nucleótidos e a estrutura secundária de um aptâmero anti-C5 (SEQ ID NO: 1), em que os resíduos sublinhados são ou resíduos de 2'-H pirimidina ou resíduos de 2'-fluoro pirimidina, os resíduos em caixa são ou resíduos de 2'-fluoro pirimidina ou resíduos de 2'-OMe pirimidina, e os resíduos indicados por uma seta (→) representam resíduos que devem conter uma modificação 2'-fluoro.

A Figura 3B é uma ilustração representando a sequência de nucleótidos e a estrutura secundária do aptâmero anti-C5 ARC330 (SEQ ID NO: 2), em que os resíduos circulados são resíduos 2'-H, os resíduos de pirimidina são 2'-fluoro substituídos, e a maioria dos resíduos de purina são 2'-OMe substituídos, exceto para os três resíduos de 2'-OH purina mostrados em contorno.

A Figura 3C é uma ilustração representando a sequência de nucleótidos e a estrutura secundária do aptâmero anti-C5 ARC186 (SEQ ID NO: 4) em que todos os 21 resíduos de pirimidina têm modificações 2'-fluoro e a maioria das purinas (14 resíduos) têm modificações 2'-OMe, exceto para os três resíduos de 2'-OH purina mostrados em contorno.

A Figura 4 é uma ilustração de um PEG ramificado de 40 kD (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida)).

A Figura 5 é uma ilustração de um PEG ramificado de 40 kD (1,3-bis(mPEG-[20 kDa]) propil-2-(4'-butamida) ligado à extremidade 5' de um aptâmero.

A Figura 6 é uma ilustração representando várias estratégias para a síntese de conjugados de ácido nucleico-PEG de elevada massa molecular.

A Figura 7A é um gráfico comparando a inibição dependente da dose de hemólise por parte de aptâmeros anti-C5 PEGuilados (ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62), e ARC187 (SEQ ID NO: 5)), a um aptâmero anti-C5 não PEGuilado (ARC186 (SEQ ID NO: 4)); a Figura 7B é um quadro dos valores de CI_{50} dos aptâmeros utilizados no ensaio de hemólise ilustrado na Figura 7A; a Figura 7C é um gráfico comparando a inibição dependente da dose de hemólise por parte de aptâmeros anti-C5 PEGuilados ARC187 (SEQ ID NO: 5), ARC1537 (SEQ ID NO: 65), ARC1730 (SEQ ID NO: 66), e ARC1905 (SEQ ID NO: 67); a Figura 7D é um quadro dos valores de CI_{50} dos aptâmeros utilizados no ensaio de hemólise apresentado na Figura 7C.

A Figura 8 é um gráfico de percentagem de inibição de hemólise por parte do aptâmero anti-C5, ARC658 (SEQ ID NO: 62), de complemento do soro de cinomolgo em função do complemento do soro humano.

A Figura 9 é um gráfico ilustrando a ligação de ARC186 (SEQ ID NO: 4) a proteína C5 purificada tanto a 37 °C como à temperatura ambiente (23 °C) após uma incubação de 15 minutos.

A Figura 10 é outro gráfico ilustrando a ligação de ARC186 (SEQ ID NO: 4) a proteína C5 purificada tanto a 37 °C como à temperatura ambiente (23 °C) após uma incubação de 4 horas.

A Figura 11 é um gráfico mostrando um curso de tempo de dissociação de um complexo C5-ARC186 a 23 °C.

A Figura 12 é um gráfico mostrando um curso de tempo de equilíbrio na formação de um complexo C5-ARC186 a 23 °C.

A Figura 13 é um gráfico ilustrando ARC 186 (SEQ ID NO: 4) ligando à proteína C5 frente a componentes da proteína a montante e a jusante na cascata do complemento.

A Figura 14 é um gráfico ilustrando a percentagem de ARC 186 radioetiquetado (SEQ ID NO: 4) que liga a C5 na presença de ARC186 competidor não marcado (SEQ ID NO: 4), ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) ou ARC187 (SEQ ID NO: 5).

A Figura 15 é um gráfico ilustrando a quantidade de proteína do complemento C5b produzida em amostras de sangue incubadas durante 5 horas a 25 °C e 37 °C na presença de concentrações variadas do aptâmero ARC186 (SEQ ID NO: 4).

A Figura 16 é um gráfico ilustrando percentagem de inibição do complemento por parte de ARC187 (SEQ ID NO: 5) na presença de zimosano em soro humano não diluído, sangue total humano com citrato ou soro de cinomolgo.

A Figura 17 é um gráfico mostrando que ARC658 (SEQ ID NO: 62) inibe completamente a ativação do complemento (C5a) no modelo de ansa de tubo descrito no Exemplo 1D.

A Figura 18 é um gráfico ilustrando as constantes de dissociação para a Ronda 10 dos conjuntos de seleção de C5. As constantes de dissociação (K_d s) foram estimadas ajustando os dados à equação: fração de ARN ligado = $\text{amplitude} \cdot K_d / (K_d + [C5])$. "ARC520" (SEQ ID NO: 70) refere-se ao conjunto dRmY não selecionado não exposto e o "+" indica a presença de competidor (0,1 mg/ml de ARNt, 0,1 mg/ml de ADN de esperma de salmão).

A Figura 19 é um gráfico ilustrando curvas de constante de dissociação de clone C5. As constantes de dissociação (K_d s) foram estimadas por meio do ajuste dos dados à equação: fração de ARN ligado = $\text{amplitude} \cdot K_d / (K_d + [C5])$.

A Figura 20 é um gráfico ilustrando uma curva de CI_{50} que

ilustra o efeito inibidor sobre a atividade de hemólise de concentrações variadas do clone de aptâmero anti-C5 ARC913 (SEQ ID NO: 75) em comparação com ARC186 (SEQ ID NO: 4).

A Figura 21 é uma ilustração representando a estrutura de ARC187 (SEQ ID NO: 5).

A Figura 22 é uma ilustração representando a estrutura de ARC1905 (SEQ ID NO: 67).

A Figura 23 é um quadro delineando o desenho experimental do primeiro estudo do coração perfundido isolado.

A Figura 24 é um gráfico comparando os traçados de pressão para a pressão intraventricular no ventrículo esquerdo (VE) de um coração isolado exposto a plasma humano (A) com os traçados de pressão LVP de um coração isolado exposto à solução de aptâmero de controlo (B).

A Figura 25 é um gráfico comparando os traçados de pressão à pressão intraventricular no ventrículo esquerdo (VE) dos corações isolados expostos ao equivalente molar, soluções de 10X e 50X aptâmero/C5 (onde uma concentração de aproximadamente 500 nM é adotada para C5 em plasma humano normal, não diluído).

A Figura 26 é um gráfico comparando as alterações da taxa cardíaca em batimentos por minuto (bpm) em corações de ratinho isolados após exposição a plasma humano e várias soluções de plasma/aptâmero.

A Figura 27 é um gráfico comparando as alterações da massa do coração em corações de ratinho isolados antes e depois da exposição ao plasma humano contendo ARC186 a razão molar 0-1X de (SEQ ID NO: 4) (corações que falharam), ou razão molar de 10-50X (corações protegidos com aptâmero C5).

A Figura 28 é um gráfico comparando a produção relativa de C5a no plasma humano, contendo concentrações variadas de aptâmero, após perfusão através de corações de ratinho isolados. As concentrações relativas de C5a são dispostas

em gráfico como unidades de absorvância (Abs), onde maiores leituras refletem a presença de maiores níveis de C5a.

A Figura 29 é um gráfico comparando a produção relativa de C5b-9 solúvel no plasma humano contendo concentrações variadas de aptâmero, depois da perfusão através de corações de ratinho isolados.

A Figura 30 é um gráfico mostrando o efeito de ARC186 (SEQ ID NO: 4) na clivagem de C3 no efluente de coração de ratinho.

A Figura 31 é um quadro mostrando os resultados de coloração imunohistoquímica para o estudo do coração de ratinho perfundido isolado.

A Figura 32 é um quadro mostrando a razão molar de ARC658 (SEQ ID NO: 62) necessária, em soro humano ou de primata, para proteger o coração do dano mediado por C5b.

A Figura 33 é um gráfico mostrando um gráfico log-linear da percentagem restante de ARC186 de cadeia completa como uma função do tempo de incubação em plasma tanto de rato quanto de macaco cinomolgo.

A Figura 34 é um quadro mostrando o desenho experimental do estudo farmacocinético conduzido em ratos Sprague-Dawley conforme descrito no Exemplo 5.

A Figura 35 é um quadro mostrando concentração em plasma média de C657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) ou ARC187 (SEQ ID NO: 5) em função do tempo em ratos Sprague-Dawley.

A Figura 36 é um gráfico ilustrando concentração em plasma média de ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) e ARC187 (SEQ ID NO: 5) sobre o tempo após administração intravenosa de aptâmero em ratos.

A Figura 37 é um quadro mostrando a análise não compartimental dos dados de concentração frente a tempo ilustrados nas Figuras 35 e 36.

A Figura 38A é um quadro mostrando o desenho para o

estudo farmacocinético de ARC187 (SEQ ID NO: 5) e ARC1905 (SEQ ID NO: 67) em ratinhos; a Figura 38B é um gráfico ilustrando o perfil farmacocinético de ARC187 (SEQ ID NO: 5) e ARC1905 (SEQ ID NO: 67) em ratinhos CD-1 depois de uma única administração em bólus IV; a Figura 38C é um quadro mostrando a análise não compartimental dos dados de concentração frente a tempo ilustrados na Figura 38B. A Figura 39 é um quadro mostrando a detecção dos aptâmeros listados em tecido cardíaco de ratinho após administração intravenosa.

A Figura 40 é um quadro mostrando o desenho experimental do Estudo animal 1, descrito no Exemplo 5E.

A Figura 41 é um quadro mostrando concentração em plasma de aptâmero frente a tempo após administração de bólus intravenoso de aptâmero a macacos cinomolgos.

A Figura 42 é um quadro listando os parâmetros farmacocinéticos para ARC657 (SEQ ID NO: 10 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) e ARC187 (SEQ ID NO: 5) administrados por via intravenosa a macaco cinomolgo no estudo 1.

As Figuras 43(a) e 43(c) são gráficos ilustrando concentrações em plasma de sC5b-9 e C5a ao longo do tempo após administração intravenosa dos aptâmeros anti-C5 ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62), ou ARC187 (SEQ ID NO: 5) a macacos cinomolgos; as Figuras 43(b) e 43(d) são gráficos ilustrando concentrações em plasma de sC5b-9 e C5a frente a concentração de aptâmeros anti-C5, ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62), ou ARC187 (SEQ ID NO: 5).

A Figura 44 é um quadro mostrando o desenho experimental do Estudo 2, descrito no Exemplo 5F.

A Figura 45 é um gráfico mostrando a concentração em plasma média de aptâmero em vários pontos de tempo após administração intravenosa de ARC658 (SEQ ID NO: 62), ou ARC187 (SEQ ID NO: 5) a macacos cinomolgos.

A Figura 46 é um quadro mostrando as duas análises

compartimentais dos dados de concentração frente a tempo após administração de aptâmero em bólus intravenoso a macaco cinomolgo.

A Figura 47 é um gráfico ilustrando concentração de CSb-9 frente a concentração de ARC187 (SEQ ID NO: 5) ou ARC658 (SEQ.ID NO: 62) na presença de zimosano em plasma cinomolgo.

A Figura 48 é um gráfico ilustrando concentração de C5a frente a concentração de ARC187 (SEQ ID NO: 5) ou ARC658 (SEQ ID NO: 62) na presença de zimosano em plasma cinomolgo.

A Figura 49 é um quadro resumindo o estudo PK-PD de ARC187 (SEQ 1 NO: 5) durante e após administração em bólus IV mais infusão a macacos cinomolgos.

A Figura 50 é um quadro resumindo os parâmetros farmacocinéticos para ARC187 (SEQ ID NO: 5) em macacos cinomolgos após administração em bólus IV.

A Figura 51 é um gráfico ilustrando os perfis farmacocinético medido calculado e real de ARC187 (SEQ ID NO: 5) durante e após administração em bólus IV mais infusão a macacos cinomolgos.

A Figura 52 é um gráfico mostrando que os níveis plasmáticos de ARC187 ativo (SEQ ID NO: 5) permanecem constantes durante e após administração em bólus IV mais infusão a macacos cinomolgos.

A Figura 53 é um quadro mostrando os requisitos de dosagem humana previstos para aptâmeros anti-C5 em cirurgia CABG.

A Figura 54 é um gráfico mostrando que ARC187 (SEQ ID NO: 5) não tem relativamente qualquer efeito *in vitro* sobre a coagulação conforme medido através do tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT).

A Figura 55 é um quadro resumindo os efeitos *in vitro* de ARC187 (SEQ ID NO: 5) sobre a atividade anticoagulante da

heparina, e atividade pró-coagulante da protamina.

A Figura 56 é um gráfico mostrando que ARC187 (SEQ ID NO: 5) não afeta a reversão da anticoagulação da heparina *in vivo*.

A Figura 57 é um gráfico mostrando que tanto a heparina como a protamina não possuem nenhum efeito sobre a função anti-complemento do ARC187 (SEQ ID NO: 5), medida por meio da inibição da ativação do complemento por parte de zimosano.

A Figura 58 é um gráfico ilustrando a percentagem de inibição de hemólise de eritrócitos de ovelha na presença de soro humano como uma função de concentração de aptâmeros anti-C5 ARC1905 (SEQ ID NO: 67) ou ARC672 (SEQ ID NO: 63).

A Figura 59A é um gráfico ilustrando a percentagem de inibição de hemólise na presença de soro humano, de macaco cinomolgo e de rato por parte de ARC1905 (SEQ ID NO: 67); a Figura 59B é um quadro resumindo os valores de CI_{50} médios para inibição de ativação do complemento em soro humano, de macaco cinomolgo e de rato por parte de C1905, um aptâmero anti-C5 ou ARC127, um aptâmero irrelevante que não liga a C5 (controlo negativo).

A Figura 60 é um gráfico ilustrando o valor de CI_{50} para inibição de ARC186 radioetiquetado (SEQ ID NO: 4) (eixo vertical) como uma função de concentração de competidor não etiquetado ARC1905 (SEQ ID NO: 67) ou ARC672 (SEQ ID NO: 63) (eixo horizontal), num ensaio de ligação de competição.

A Figura 61 é um gráfico ilustrando o valor de CI_{50} para inibição de ARC186 radioetiquetado (SEQ ID NO: 4) (eixo vertical) como uma função de concentração de competidor não etiquetado ARC1905 (SEQ ID NO: 67) (eixo horizontal) a 37 °C e 25 °C num ensaio de ligação de competição.

A Figura 62 é um gráfico ilustrando curvas padrão para C5a humano (hC5a) e C5a de macaco cinomolgo (hC5a eq).

A Figura 63 é um quadro resumindo os valores de CI_{50} , CI_{90} e CI_{99} para inibição de ativação de C5 em soro humano e de macaco cinomolgo por parte de ARC1905 (SEQ ID NO: 67), conforme medido num ensaio de ativação do complemento induzido por zimosano.

A Figura 64 é um gráfico ilustrando a percentagem de inibição de geração de C5a como uma função de concentração de ARC1905 (SEQ ID NO: 67) em soros humanos e de macacos cinomolgos conforme medido num ensaio de ativação do complemento induzido por zimosano.

A Figura 65 é um gráfico ilustrando o efeito de ARC1905 (SEQ ID NO: 67) na geração de C3a em soro humano e de macaco cinomolgo, conforme medido num ensaio de ativação do complemento induzido por zimosano.

A Figura 66 é um quadro resumindo os valores de CI_{50} , CI_{90} e CI_{99} médios para inibição por parte de ARC1905 da ativação do complemento (SEQ ID NO: 67) em soro humano a partir de 5 dadores, conforme medido num modelo de ansa de tubo de ativação do complemento.

A Figura 67 é um gráfico ilustrando a percentagem de inibição de geração de C5a e C3a como uma função da concentração de ACRC1905, um aptâmero anti-C5, ou ARC127, um aptâmero irrelevante que não liga a C5 (controlo negativo) num modelo de ansa de tubo de ativação do complemento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratamento, estabilização e/ou prevenção de degeneração macular relacionada com a idade (DMRI) de tipo não exsudativo de acordo com a reivindicação 1.

Em formas de realização da invenção, o aptâmero anti-complemento modula uma função de um componente do complemento ou uma variante do mesmo. Em formas de realização particularmente preferidas, um aptâmero anti-

complemento inibe ou diminui uma função do componente do complemento ou uma variante do mesmo, preferentemente *in vivo*, preferentemente num vertebrado, preferentemente um mamífero, mais preferentemente *in vivo* em seres humanos. Nalgumas formas de realização da invenção, onde C5 for o complemento alvo, a função modulada, preferentemente inibida, por parte do aptâmero é a clivagem de proteína do complemento. Nalgumas formas de realização da invenção, por exemplo, onde C2b, C5b, C6, C7, C8, C9, Fator B e/ou properdina for o complemento alvo, a função modulada, preferentemente inibida, por parte do aptâmero é a montagem de um agregado de componente de complemento ativo, tal como uma convertase ou o complexo de ataque à membrana.

Numa forma de realização, o método de estabilização, tratamento e/ou prevenção compreende a etapa de administrar o aptâmero anti-C5 a um indivíduo em necessidade do mesmo numa quantidade suficiente para estabilizar, tratar e/ou prevenir DMRI de tipo não exsudativo.

Nalgumas formas de realização, o método de estabilização, tratamento e/ou prevenção compreende a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do aptâmero anti-complemento a um indivíduo em necessidade do mesmo. A quantidade terapeuticamente eficaz do aptâmero anti-complemento é uma quantidade suficiente para estabilizar, tratar e/ou prevenir DMRI de tipo não exsudativo.

Nalgumas formas de realização, é proporcionado um método de estabilização de DMRI de tipo não exsudativo compreendendo administrar o aptâmero anti-complemento a um indivíduo em necessidade do mesmo numa quantidade suficiente para estabilizar DMRI de tipo não exsudativo. Nalgumas formas de realização, o aptâmero anti-complemento é administrado numa quantidade suficiente para manter pelo menos o mesmo nível de acuidade visual do indivíduo em comparação com o nível de acuidade visual do indivíduo após

administração do aptâmero anti-complemento. Nalgumas formas de realização, o aptâmero anti-complemento é administrado numa quantidade suficiente para manter cerca do mesmo nível de densidade dos vasos retiniais do indivíduo que o do indivíduo após administração do aptâmero anti-complemento. Nalgumas formas de realização, o aptâmero anti-complemento é administrado numa quantidade suficiente para estabilizar ou manter o nível de sangramento associado a neurovascularização, acumulação de fluido, descolamento e/ou cicatrização da retina no indivíduo em relação ao nível de sangramento associado à neurovascularização do indivíduo, acumulação de fluido, descolamento da retina e/ou cicatrização após administração do aptâmero anti-complemento.

Nalgumas formas de realização, é proporcionado um método de tratamento de DMRI de tipo não exsudativo, compreendendo administrar o aptâmero anti-complemento a um indivíduo em necessidade do mesmo numa quantidade suficiente para reduzir um sintoma de DMRI de tipo não exsudativo. Nalgumas formas de realização o aptâmero anti-complemento é administrado numa quantidade suficiente para melhorar o nível de acuidade visual no indivíduo em relação ao nível de acuidade visual do indivíduo após administração do agente anti-complemento. Nalgumas formas de realização, o aptâmero anti-complemento é administrado numa quantidade suficiente para reduzir o nível de densidade dos vasos retiniais no indivíduo em relação ao nível de densidade dos vasos retiniais do indivíduo após administração do aptâmero anti-complemento. Nalgumas formas de realização, o aptâmero anti-complemento é administrado numa quantidade suficiente para reduzir o nível de sangramento associado à neurovascularização, acumulação de fluido, descolamento da retina e/ou cicatrização no indivíduo em relação ao nível de sangramento associado à neurovascularização do indivíduo, acumulação de fluido, descolamento da retina

e/ou nível de cicatrização após administração do aptâmero anti-complemento.

Nalgumas formas de realização, é proporcionado um método de prevenção de DMRI de tipo não exsudativo num indivíduo, o método compreendendo a etapa de administrar o aptâmero anti-complemento ao indivíduo numa quantidade suficiente para prevenir um sintoma clínico da DMRI de tipo não exsudativo. Nalgumas formas de realização, o aptâmero anti-complemento é administrado numa quantidade suficiente para prevenir a perda clínica de acuidade visual no indivíduo. Nalgumas formas de realização, o aptâmero anti-complemento é administrado numa quantidade suficiente para prevenir um nível de densidade dos vasos retiniais no indivíduo correlativo a doença neurovascular ocular clínica. Nalgumas formas de realização, o indivíduo encontra-se em risco de desenvolver DMRI de tipo não exsudativo. Nalgumas formas de realização, o método compreende adicionalmente identificar um indivíduo em risco de desenvolver DMRI de tipo não exsudativo antes da administração do aptâmero anti-complemento. Nalgumas formas de realização, a etapa de identificação compreende detetar a presença de drusas e/ou alterações da pigmentação retinal no indivíduo e não detetar qualquer perda clínica de acuidade visual. Nalgumas formas de realização, a etapa de identificação compreende detetar uma variação no fator H do complemento do indivíduo em relação ao fator H de tipo selvagem. A sequência de aminoácidos do fator H de tipo selvagem é relatada em Ripoche *et al.* (1988) The complete aminoacid sequence of human complement factor H. *Biochem. J.* 249, 593- 602. Nalgumas formas de realização, a via de administração do aptâmero anti-complemento é administração ocular ou periocular.

Nalgumas formas de realização dos métodos descritos acima, o método compreende adicionalmente a etapa de administrar ao indivíduo um agente anti-VEGF,

particularmente um agente anti-VEGF selecionado a partir do grupo consistindo em: uma molécula de ácido nucleico, um aptâmero, uma molécula anti-sentido, uma molécula de ARNi, uma proteína, um péptido, um péptido cíclico, um anticorpo ou fragmento de anticorpo, um açúcar, um polímero, e uma molécula pequena.

Nalgumas formas de realização dos métodos descritos acima, o método compreende adicionalmente a etapa de administrar ao indivíduo um agente anti-PDGF, particularmente um agente anti-PDGF é selecionado a partir do grupo consistindo em: uma molécula de ácido nucleico, um aptâmero, uma molécula anti-sentido, uma molécula de ARNi, uma proteína, um péptido, um péptido cíclico, um anticorpo ou fragmento de anticorpo, um açúcar, um polímero, e uma molécula pequena.

Nalgumas formas de realização dos métodos descritos acima, o método compreende adicionalmente administrar um agente anti-vascular ao indivíduo. Nalgumas formas de realização, o agente anti-vascular é um derivado de porfirina. Nalgumas formas de realização o derivado de porfirina, é verteporfina para injeção (Visudyne®, Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ). Nalgumas formas de realização, o método compreende adicionalmente a etapa de ativar o derivado de porfirina com luz *laser*.

Em formas de realização da invenção o aptâmero anti-C5 é SEQ ID NOs 4, 5 ou 67. Numa forma de realização preferida, o aptâmero específico de C5 para utilização nos métodos descritos acima é selecionado a partir do grupo consistindo em ARC187 (SEQ ID NO: 5) e ARC1905 (SEQ ID NO: 67).

Nalgumas formas de realização dos métodos descritos acima, o aptâmero anti-C5 é administrado através de administração ocular, particularmente através de administração intravítrea. Nalgumas formas de realização dos métodos descritos acima o agente anti-VEGF, o agente

anti-PDGF e/ou o agente anti-vascular é administrado através de administração ocular. Nalgumas formas de realização dos métodos descritos acima, o agente anti-C5, o agente anti-VEGF, o agente anti-PDGF e/ou o agente anti-vascular a ser administrado é um pró-fármaco. Nalgumas formas de realização dos métodos descritos acima, o indivíduo é um ser humano.

O aptâmero anti-complemento inibe um complemento alvo selecionado a partir de C5. Nalgumas formas de realização, o aptâmero anti-complemento não é um aptâmero com afinidade e alta especificidade para um complemento alvo eleito a partir do grupo consistindo em: recetor de C3a, recetor de C3a, C5a, e recetor de C5a. Nalgumas formas de realização, o aptâmero anti-complemento não é um aptâmero com afinidade e alta especificidade para um complemento alvo eleito a partir do grupo consistindo em: fator B e fator D.

Nalgumas formas de realização dos métodos descritos acima, o aptâmero anti-complemento é administrado a um indivíduo através de administração ocular, particularmente através de administração intravítrea ou periocular. Nalgumas formas de realização, o aptâmero anti-complemento a ser administrado a um indivíduo está compreendido numa formulação de depósito.

O termo "após administração do aptâmero anti-complemento" conforme utilizado no presente documento abrange o tempo no qual o sintoma em questão foi clinicamente medido ou estimado onde a medição ou estimação foi no tempo variando desde antes da administração do aptâmero anti-complemento até e incluindo a medição pouco depois da administração do aptâmero anti-complemento, por exemplo, até 12 horas depois, 24 horas depois ou 48 horas depois da administração.

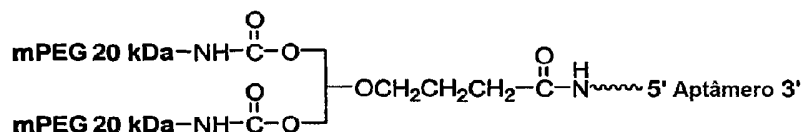
Nalgumas formas de realização, é proporcionada uma composição farmacêutica ocular compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um aptâmero anti-complemento,

por exemplo, uma quantidade suficiente para estabilizar, tratar e/ou prevenir um distúrbio ocular mediado pelo complemento. A composição farmacêutica da invenção pode compreender um portador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Neste aspeto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um aptâmero que inibe uma função alvo do complemento ocular *in vivo*, particularmente num indivíduo humano, ou um sal do mesmo e um portador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Nalgumas formas de realização, a composição farmacêutica ocular compreende uma formulação de depósito.

Numa forma de realização, o aptâmero anti-complemento para utilização nos métodos acima é um aptâmero que inibe C5 *in vivo*, preferentemente C5 humano. Numa forma de realização particular, é proporcionado um aptâmero anti-C5 de acordo com ARC186 (SEQ ID NO: 4) ou um aptâmero compreendendo uma sequência de nucleótidos de acordo com ARC186 (SEQ ID NO: 4) conjugado com uma fração PEG para utilização nos métodos acima. Em formas de realização particulares, este conjugado de aptâmero ARC186/PEG compreende substancialmente a mesma afinidade de ligação para a proteína de complemento C5 que um aptâmero consistindo na sequência de acordo com a SEQ ID NO: 4 mas carecendo da fração PEG. Substancialmente a mesma afinidade de ligação conforme utilizado no presente documento significa não mais do que cerca de uma diferença de 2 a dez vezes, preferentemente não mais do que uma diferença de 2 a cinco vezes das constantes de dissociação conforme medido através de análise *dot blot*. Nalgumas formas de realização as constantes de dissociação são medidas através de análise *dot blot* competitiva conforme descrito no Exemplo 1A abaixo. Nalgumas formas de realização, a fração polietilenoglicol compreende uma massa molecular maior do que 10 kDA, particularmente uma massa molecular de 20 kDA,

mais particularmente 30 kDa e mais particularmente 40 kDa. Nalgumas formas de realização, a fração PEG é conjugada ou terminal 5' de ARC 186 (SEQ ID NO: 4). Nalgumas formas de realização o conjugado aptâmero/PEG compreende uma semivida, preferentemente a semivida terminal num modelo de dois compartimentos conforme determinado através do método descrito no Exemplo 5E abaixo, de pelo menos 15 horas, preferentemente pelo menos 24 horas, mais preferentemente pelo menos 48 horas num primata. Nalgumas formas de realização o conjugado aptâmero/PEG compreende uma semivida, preferentemente a semivida terminal num modelo de dois compartimentos, de pelo menos 10, preferentemente pelo menos 15 horas num rato. Nalgumas formas de realização, o PEG conjugado ao terminal 5' de ARC186 (SEQ ID NO: 4) é um PEG de 40 kDa. Em formas de realização particulares o PEG de 40 kDa é um PEG ramificado. Nalgumas formas de realização o PEG de 40 kDa ramificado é 1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida). Noutras formas de realização o PEG de 40 kDa ramificado é 2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamóilo.

Em formas de realização onde o PEG de 40 kDa ramificado é 1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida), é proporcionado um aptâmero tendo a estrutura estabelecida abaixo:



onde,

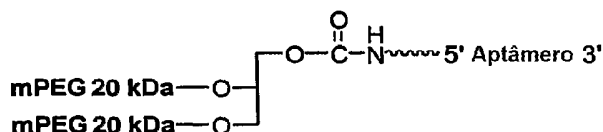
“~” indica um ligante

Aptâmero

=

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUfUAfCf CfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO: 4)

em que fC e fU = nucleótidos 2'-fluoro, e mG e mA = nucleótidos 2'-OMe e todos os outros nucleótidos são 2'-OH e 3T indica desoxitimidina invertida.



onde,

“” indica um ligante

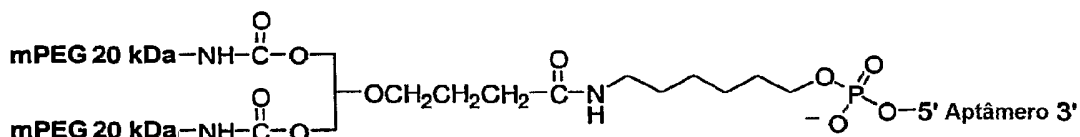
Aptâmero

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUfUAfCf CfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO: 4)

em que fC e fU = nucleótidos 2'-fluoro, e mG e mA = nucleótidos 2'-OMe e todos os outros nucleótidos são 2'-OH e onde 3T indica desoxitimidina invertida.

Nalgumas formas de realização deste aspeto da invenção o ligante é um ligante alquilo. Em formas de realização particulares, o ligante alquilo compreende 2 a 18 grupos CH₂ consecutivos. Em formas de realização preferidas, o ligante alquilo compreende 2 a 12 grupos CH₂ consecutivos. Em formas de realização particularmente preferidas o ligante alquilo compreende 3 a 6 grupos CH₂ consecutivos.

Numa forma de realização particular é proporcionado um aptâmero, ARC187 (SEQ ID NO: 5), tendo a estrutura estabelecida abaixo:



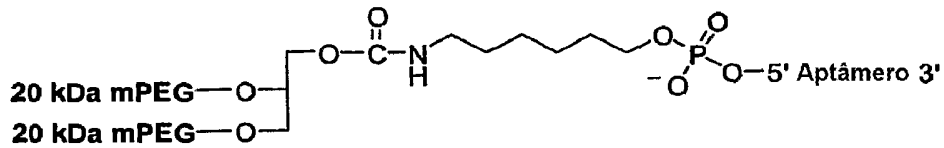
onde

Aptâmero

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUfUAfCf CfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO: 4)

em que fC e fU = nucleótidos 2'-fluoro, e mG e mA = nucleótidos 2'-OMe e todos os outros nucleótidos são 2'-OH e onde 3T indica desoxitimidina invertida.

Noutra forma de realização particular é proporcionado um aptâmero, ARC1905 (SEQ ID NO: 67), tendo a estrutura estabelecida abaixo:



onde **Aptâmero** =
 fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUf
 UAfCf CfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO: 4)
 em que fC e fU = nucleótidos 2'-fluoro, e mG e mA =
 nucleótidos 2'-OMe e todos os outros nucleótidos são 2'-OH
 e onde 3T indica desoxitimidina invertida.

Numa forma de realização, é proporcionado uma composição farmacêutica ocular compreendendo uma quantidade de ARC 186 (SEQ ID NO 4), ARC 187 (SEQ ID NO: 5) ou ARC 1905 (SEQ ID NO: 67) ou um sal dos mesmos eficaz para tratar, estabilizar e/ou prevenir DMRI de tipo não exsudativo num indivíduo. A composição farmacêutica da invenção pode compreender um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável. Neste aspeto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz do aptâmero que inibe a clivagem de proteína do complemento C5 *in vivo* ou um sal da mesma e um portador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Neste aspeto da invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica de ARC186 (SEQ ID NO 4), ARC187 (SEQ ID NO: 5) ou ARC1905 (SEQ ID NO: 67) para utilização no tratamento, estabilização e/ou prevenção de DMRI de tipo não exsudativo *in vivo*. Também, neste aspeto da invenção, é proporcionado ARC1905ARC 186 (SEQ ID NO 4), ARC187 (SEQ ID NO: 5) ou ARC1905 (SEQ ID NO: 67) para utilização na preparação de uma composição farmacêutica para tratamento, estabilização e/ou prevenção de DMRI de tipo não exsudativo num indivíduo.

Noutro aspeto, a invenção proporciona composições farmacêuticas. Numa forma de realização, é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de ARC 187 (SEQ ID NO: 5) ou ARC

1905 (SEQ ID NO: 67) ou um sal da mesma. A composição farmacêutica da invenção pode compreender um portador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Neste aspeto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um aptâmero que inibe a clivagem da proteína de complemento C5 *in vivo* ou um sal do mesmo e um portador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Neste aspeto da invenção é proporcionada uma composição farmacêutica de ARC187 (SEQ ID NO: 5) ou ARC1905 (SEQ ID NO: 67) para utilização no tratamento, prevenção ou melhora da doença *in vivo*. Também, neste aspeto da invenção são proporcionados ARC187 (SEQ ID NO: 5) ou ARC1905 (SEQ ID NO: 67) para a utilização na preparação de uma composição farmacêutica.

Nalgumas formas de realização, o método da invenção inclui administrar a composição farmacêutica compreendendo ARC187 (SEQ ID NO: 5) ou ARC1905 (SEQ ID NO: 67) para alcançar uma concentração em plasma de aptâmero que é cerca de 0,5 a cerca de 10 vezes que da proteína endógena do complemento C5. Nalgumas formas de realização, as composições farmacêuticas de aptâmero ARC187 (SEQ ID NO: 5) ou ARC1905 (SEQ ID NO: 67) são administradas para alcançar uma concentração em plasma de aptâmero que é cerca de 0,75 a cerca de 5 vezes, 0,75 a cerca de 3 vezes, e 1,5 a cerca de 2 vezes que da proteína endógena do complemento C5, enquanto noutras formas de realização a composição de aptâmero é administrada para alcançar uma concentração equivalente à da proteína endógena do complemento. Nalgumas formas de realização, a composição farmacêutica da invenção compreendendo ARC187 (SEQ ID NO: 5) ou ARC1905 (SEQ ID NO: 67) é administrada para alcançar uma concentração em plasma de aptâmero de cerca de 5 μM , cerca de 4 μM , cerca de 3 μM , cerca de 2 μM , cerca de 1,5 μM , cerca de 1 μM ou de cerca de 500 nM.

Pode ser utilizada qualquer combinação de via, duração

e taxa de administração que seja suficiente para alcançar a concentração em plasma de aptâmeros da invenção. Nalgumas formas de realização a composição farmacêutica é administrada por via intravenosa. Nalgumas formas de realização, a composição farmacêutica é administrada na forma de um bólus e/ou por meio de infusão contínua.

Em formas de realização preferidas, o aptâmero modula uma função de uma proteína do complemento C5 ou uma variante da mesma. Em formas de realização particularmente preferidas, o aptâmero inibe uma função de proteína do complemento C5 ou uma variante deste, preferentemente *in vivo*, mais preferentemente *in vivo* em seres humanos. Numa forma de realização deste aspeto da invenção, a função modulada, preferentemente inibida, por parte do aptâmero é a clivagem de proteína do complemento C5.

A divulgação proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um aptâmero que bloqueia a clivagem de proteína do complemento C5 *in vivo* ou um sal do mesmo e um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

Nalgumas formas de realização, o método da invenção inclui administrar a composição farmacêutica compreendendo um aptâmero de acordo com a reivindicação 1 a um paciente para alcançar uma concentração de aptâmero em plasma que é cerca de 0,5 a cerca de 10 vezes a da proteína de complemento C5 endógena. Nalgumas formas de realização, as composições farmacêuticas de aptâmero são administradas para alcançar uma concentração de aptâmero em plasma que é cerca de 0,75 a cerca de 5 vezes, 0,75 a cerca de 3 vezes, e 1,5 a cerca de 2 vezes a da proteína de complemento C5 endógena enquanto noutras formas de realização a composição de aptâmero é administrada para alcançar uma concentração equivalente à da proteína de complemento endógena. Nalgumas formas de realização, a composição farmacêutica da invenção administrada alcançar uma concentração de aptâmero em

plasma de cerca de 5 μM , cerca de 4 μM , cerca de 3 μM , cerca de 2 μM , cerca de 1,5 μM , cerca de 1 μM ou de cerca de 500 nM.

Pode ser utilizada qualquer combinação de via, duração e taxa de administração que seja suficiente para alcançar a concentração em plasma de aptâmeros da invenção. Nalgumas formas de realização a composição farmacêutica é administrada por via intravenosa. Nalgumas formas de realização, a composição farmacêutica é administrada na forma de um bólus e/ou através de infusão contínua.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os detalhes de uma ou mais formas de realização da invenção são estabelecidos na descrição acompanhante abaixo. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos no presente documento possam ser utilizados na prática ou testagem da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são agora descritos. Outras características, objetivos e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição. Na memória descritiva, as formas singulares também incluem o plural a não ser que o contexto claramente dite de outra forma. A não ser que de outra forma definido, todos os termos técnicos e científicos utilizados no presente documento têm os mesmos significados comumente entendidos por parte de um perito na especialidade à qual esta invenção pertence. No caso de conflito, prevalecerá a presente Memória Descritiva.

Agentes Anti-C5 e Distúrbios Oculares

Dados recentes sugerem que a degeneração macular relacionada com a idade (DMRI) também é uma doença mediada por inflamação com a ativação do complemento exercendo um papel. A degeneração macular relacionada com a idade ("DMRI") é uma doença ocular crónica e progressiva e que é a causa principal de perda irreparável da visão nos Estados Unidos, Europa e Japão. A DMRI é caracterizada pela deterioração progressiva da porção central da retina

referida como a mácula. O indicador mais claro da progressão para DMRI é a aparência de drusas, depósitos branco-amarelados sobre a retina, que são placas de material que são derivadas a partir dos produtos de resíduo metabólico das células da retina. A aparência das drusas é um importante componente de ambas formas de DMRI: exsudativa ("húmida") e não exsudativa ("seca"). A DMRI húmida ocorre quando novos vasos sanguíneos que crescem imediatamente por baixo da retina invadem as camadas retiniais por meio de uma membrana conhecida como membrana de Bruch. Este crescimento anormal dos vasos sanguíneos geralmente é referido como angiogénese ou neovascularização (coroidal). Estes novos vasos sanguíneos tendem a ser frágeis e frequentemente sangram e vazam fluido na mácula, resultando algumas vezes em interrupção grave súbita e frequente da visão. Embora novos tratamentos (por exemplo, Lucentis™) possam parar a angiogénese e reverter a acumulação de fluido, inclusive restaurando a visão numa minoria de pacientes, a lesão neurovascular frequentemente leva a cicatrização e/ou dano das células retiniais causando perda permanente da visão. A DMRI húmida é geralmente precedida pelo desenvolvimento de drusas que se acumulam e que contêm proteínas do complemento incluindo fator H do complemento (CFH). A presença de numerosas drusas, de intermédias a grandes, é associada com o maior risco de progressão para doença de estágio tardio, caracterizada por atrofia geográfica e/ou neovascularização. A maioria dos pacientes com DMRI húmida experimenta perda de visão grave no olho afetado no prazo de meses até dois anos após diagnóstico da doença, embora a perda da visão possa ocorrer no prazo de horas ou dias. A DMRI seca é mais gradual e ocorre quando as células sensíveis à luz na mácula se atrofiam lentamente, embaçando gradualmente a visão central no olho afetado. A perda da visão é exacerbada pela formação e acumulação de drusas e algumas

vezes a deterioração da retina, embora sem crescimento e sangramento anormal de vasos sanguíneos.

Existem componentes do complemento e outros mediadores da inflamação em drusas e células inflamatórias que são observados nas lesões que causam perda de visão relacionada com a DMRI (Haines *et al.* (2005) *Science* 308: 419-421). A DMRI está fortemente associada com um defeito genético na via reguladora do complemento (Haines *et al.*, 2005). Uma variante num gene codificando para o fator H do complemento (CFH) parece contribuir grandemente ou inteiramente para o risco aumentado de DMRI por meio do seu impacto no desenvolvimento de drusas, um precursor para neovascularização e perda da visão associadas a DMRI (Edwards *et al.*, (2005) *Science* 308:421-424). A função principal de CFH é regular negativamente a atividade das convertases da cascata alternativa por meio da ligação a e inativação de C3b ou do estímulo da dissociação do fator Bb a partir de C3b. (Hageman *et al.*, (2005) *PNAS* 102(2):7227-7232). Dados genéticos recentes sugerem que uma pessoa com drusas de tipo DMRI húmida tem 50-70 % de possibilidade de portar o alelo CFH resultando numa correlação extremamente previsível e forte entre intervenção do complemento e tratamento de DMRI (Klein *et al.* (2005) *Science* 308: 385-389). Um aptâmero anti-C5 que bloqueia a sua ativação, fá-lo-á inclusive se um paciente portar o gene CFH defeituoso associado a DMRI. Igualmente, os aptâmeros que inibem a atividade dos alvos da cascata alternativa tais como fator B, fator D, e properdina, componentes da cascata normal, particularmente C3, e Componentes do Complexo de Ataque à Membrana, inibirão a atividade mesmo se um paciente portar o gene CFH defeituoso associado a DMRI. Vários haplótipos do gene do fator H do complemento (CFH) foram determinados como estando associados com o risco de uma pessoa desenvolver degeneração macular (DMRI). Em particular, uma alteração tirosina-histidina no aminoácido 402 no fator H

do complemento (CFH) no cromossoma 1 resulta na formação de uma variante do gene CFH que está fortemente associada com a suscetibilidade à doença. A alteração da sequência é numa região de CFH que liga à heparina e proteína reativa C. As pessoas cuja constituição genética inclui esta variante do gene CFH são mais propensas a desenvolver DMRI. A variante do gene CFH pode ser responsável por cerca de metade dos 15 milhões de casos de degeneração macular nos Estados Unidos. A probabilidade de desenvolver degeneração macular é aumentada em cerca de 2,5 a 5,5 vezes se um paciente tiver a variante do gene CFH.

O gene CFH está envolvido na regulação das vias inflamatórias (via alternativa de complemento). Isto implica que a inflamação também exerce um importante papel no desenvolvimento da degeneração macular. Níveis sanguíneos de uma Proteína Reativa C (CRP) marcadora de inflamação também foram observados como sendo elevados na degeneração macular (Science. 15 de Abril de 2005; 308(5720):419-21, Science. 15 de Abril de 2005; 308(5720):421-4, Science. 15 de Abril de 2005; 308(5720):385-9). Com base na sua localização na região de ligação à heparina e CRP do fator H, a variante Y402H pode interromper o recrutamento mediado por proteoglicano e CRP do fator H a superfícies de célula hospedeira, impedindo a capacidade do fator H de regular negativamente C3b depositado nestas células. A amplificação não verificada da via do complemento no tecido hospedeiro causa inflamação na retina e nos vasos sanguíneos circundantes devido à libertação descontrolada de C5a e C5b-9. CFH previne a ativação do complemento e inflamação descontroladas; assim uma mutação em CFH aumentará a inflamação e as suas consequências. Reduzindo a ativação excessiva do complemento (via inflamatória) que ocorre na degeneração macular, é possível de atrasar o progresso da doença. Adicionalmente, a deteção da variante do gene pode ser um

dia utilizada em combinação com tecnologias de formação de imagem para identificar indivíduos em alto risco de desenvolver DMRI avançada antes do que é atualmente possível. (JAMA. 20 de Abril de 2005; 293(15): 18410).

Tecidos e fluidos oculares contêm normalmente muitos componentes de complemento, tais como Fator B e C2, C4, C3, C5, C6, e C7 no tecido uveal (Brawman-Mintzer O, Invest Ophthalmol Vis Sci. Outubro de 1989; 30(10):2240-4), C1, C4, C3 e C5 no humor aquoso (Mondino BJ, Arch Ophthalmol. Março de 1983; 101(3):465-8), e C1, C4, C2, C3, C5, C6 e C7 na córnea (Mondino BJ, Arch Ophthalmol. Agosto de 1981; 99(8): 1430-3). Estes componentes do complemento e proteínas reguladoras do complemento associadas são considerados como sendo importantes para a vigilância imune normal em tecidos oculares.

Consequentemente, a presente invenção proporciona aptâmeros anti-C5 para o tratamento de DMRI de tipo não exsudativo. Nalgumas formas de realização, um aptâmero anti-C5 da invenção é utilizado por si só enquanto noutras formas de realização é utilizado em combinação com um agente anti-VEGF e/ou um anti-PDGF.

Formas de realização da presente invenção proporcionam aptâmeros anti-complemento para o tratamento, estabilização e/ou prevenção de DMRI de tipo não exsudativo. Os aptâmeros anti-complemento podem ser gerados através do método SELEX™. Em formas de realização particulares, a invenção compreende administrar um aptâmero anti-C5 a um indivíduo num método de redução, estabilização e/ou prevenção de pelo menos um sintoma de DMRI de tipo não exsudativo.

Aptâmeros Específicos de C5

Os aptâmeros específicos de C5 para utilização no tratamento, estabilização, prevenção e/ou redução dos sintomas de distúrbios oculares mediados pelo complemento podem ser gerados através do método SELEX™. Em formas de realização particulares, a invenção compreende administrar

um agente aptâmero anti-C5 a um indivíduo num método de redução, estabilização e/ou prevenção de pelo menos um sintoma de uma DMRI de tipo não exsudativo.

Os aptâmeros são moléculas de ácido nucleico com afinidade de ligação específica a moléculas por meio de interações para além do emparelhamento de bases de Watson-Crick clássico.

Os aptâmeros, como péptidos gerados através de apresentação em fagos ou anticorpos monoclonais ("mAbs"), são capazes de ligar especificamente a alvos selecionados e modular a atividade do alvo, por exemplo, por meio de ligação os aptâmeros podem bloquear a sua capacidade do alvo para funcionar. Criados através de um processo de seleção *in vitro* a partir de conjuntos de sequências aleatórias de oligonucleótidos, foram gerados aptâmeros para mais de 100 proteínas incluindo fatores de crescimento, fatores de transcrição, enzimas, imunoglobulinas, e recetores. Um aptâmero típico tem 10-15 kDa de tamanho (30-45 nucleótidos), liga ao seu alvo com afinidade subnanomolar, e discrimina contra alvos estreitamente relacionados (por exemplo, os aptâmeros tipicamente não ligarão a outras proteínas da mesma família génica). Uma série de estudos estruturais mostraram que os aptâmeros são capazes de utilizar os mesmos tipos de interações de ligação (por exemplo, ligação de hidrogénio, complementaridades eletrostáticas, contatos hidrofóbicos, exclusão estérica) que conferem afinidade e especificidade em complexos anticorpo-antigénio.

Os aptâmeros têm numerosas características desejáveis para utilização como agentes terapêuticos e de diagnóstico incluindo alta especificidade e afinidade, eficácia biológica, e excelentes propriedades farmacocinéticas.

O método SELEX™

O método preferido para gerar um aptâmero, geralmente ilustrado na Figura 2, é com um processo intitulado

"Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment" ("SELEX™"). O processo SELEX™, um método para a evolução *in vitro* de moléculas de ácidos nucleicos com ligação altamente específica às moléculas alvo, é descrito em, por exemplo, pedido de patente US com N.º de Série 07/536.428, depositado a 11 de junho de 1990, atualmente abandonado, Patente US N.º 5.475.096 intitulada "Nucleic Acids Ligands", e Patente US N.º 5.270.163 (veja-se também documento WO 91/19813) intitulada "Nucleic Acids Ligands". Por meio da realização de ciclos iterativos de seleção e amplificação SELEX™ pode ser utilizado para obter aptâmeros, também referidos no presente documento como "ligandos de ácido nucleico" com qualquer nível desejado de afinidade de ligação ao alvo.

O processo SELEX™ é baseado na visão única de que os ácidos nucleicos têm capacidade suficiente para formar uma variedade de estruturas bi e tridimensionais e versatilidade química suficiente disponível nos seus monómeros para atuar como ligandos (isto é, formar pares de ligação específica) com praticamente qualquer composto químico, seja monomérico ou polimérico. Moléculas de qualquer tamanho ou composição podem servir como alvos.

O processo SELEX™ é baseado na capacidade de ligar a um alvo. Os aptâmeros obtidos por meio do procedimento SELEX™ terão conseqüentemente a propriedade de ligação ao alvo. Entretanto, SELEX™ em si não seleciona para outras propriedades dos aptâmero ou alvo e não pode ser razoavelmente esperado que um aptâmero derivado a partir de SELEX™ tenha alguma propriedade para além de ligação ao alvo desejado, embora possa ser esperado que os aptâmeros obtidos tenham outras propriedades. Conseqüentemente, embora possa ser esperado que um aptâmero tenha um efeito particular sobre o alvo, para além da ligação ao alvo, um dado aptâmero pode não ter nenhum efeito, ou pode ter vários efeitos. Por exemplo, quando o alvo é uma proteína

que interatua com múltiplos recetores de superfície celular, um aptâmero pode atuar ou para bloquear ou para potenciar a ligação entre a proteína e um ou mais de tais recetores ou pode não ter qualquer efeito sobre nenhuma das interações. Noutro exemplo, o alvo pode ser uma espécie catalítica e um aptâmero pode bloquear ou potenciar a eficácia da função catalítica ou não ter qualquer efeito sobre a função catalítica. Contudo, antes da testagem num ensaio adequado, o perito na especialidade é incapaz de prever que propriedade, se qualquer, tem realmente um dado aptâmero. De fato, a simples ligação ao alvo não proporciona qualquer informação sobre o efeito funcional, se qualquer, que pode ser exercido no alvo através da ação da ligação ao aptâmero.

A alteração de uma propriedade da molécula alvo requer que o aptâmero ligue a uma determinada localização no alvo de maneira a efetuar uma alteração numa propriedade do alvo. Na teoria, SELEX™ pode resultar na identificação de um grande número de aptâmeros, onde cada aptâmero liga a um sítio diferente no alvo. Na prática, interações de ligação aptâmero alvo frequentemente ocorrem em ou num ou num número relativamente pequeno de locais de ligação preferidos no alvo que proporcionam interfaces estruturais estáveis e acessíveis para a interação. Além disso, quando SELEX™ é realizado numa molécula alvo fisiológica o perito na especialidade geralmente não é capaz de controlar a localização do aptâmero no alvo. Consequentemente, a localização do sítio de ligação ao aptâmero no alvo pode ou não ser em, ou perto de, um dos potencialmente vários locais de ligação que podem levar ao efeito desejado, ou podem não ter qualquer efeito sobre a molécula alvo.

Inclusive onde for constatado que um aptâmero, devido à sua capacidade de ligar ao alvo, tem um efeito, não existe maneira de prever a existência desse efeito ou de saber antecipadamente qual será o efeito. Na execução de

uma experiência de SELEX™ o perito na especialidade não pode saber com certeza que os aptâmeros, até ao ponto em que seja possível obter um aptâmero contra um alvo, terão a propriedade de ligação ao alvo. Pode ser realizada uma experiência de SELEX™ na esperança de que alguns dos aptâmeros identificados também tenham um efeito no alvo além de ligar a este, mas isto é incerto.

O método SELEX™ conta como um ponto de partida com uma grande biblioteca ou conjunto de oligonucleótidos de cadeia simples compreendendo sequências randomizadas. Os oligonucleótidos podem ser ADN, ARN, ou híbridos de ADN/ARN modificados ou não modificados. Nalguns exemplos, o conjunto compreende oligonucleótidos 100 % aleatórios ou parcialmente aleatórios. Noutros exemplos, o conjunto compreende oligonucleótidos aleatórios ou parcialmente aleatórios contendo pelo menos uma sequência fixa e/ou sequência conservada incorporada na sequência aleatória. Noutros exemplos, o conjunto compreende oligonucleótidos aleatórios ou parcialmente aleatórios contendo pelo menos uma sequência fixa e/ou sequência conservada nos seus terminais 5' e/ou 3' que pode compreender uma sequência partilhada por todas as moléculas do conjunto de oligonucleótidos. Sequências fixas são sequências comuns aos oligonucleótidos no conjunto que são incorporadas com um propósito pré-selecionado tal como motivos de CpG descritos adicionalmente abaixo, locais de hibridização para iniciadores de PCR, sequências promotoras para ARN polimerase (por exemplo, T3, T4, T7, e SP6), locais de restrição ou sequências homopoliméricas, tais como tratos poli A ou poli T, núcleos catalíticos, sítios para ligação seletiva a colunas de afinidade, e outras sequências para facilitar a clonagem e/ou sequenciamento de um oligonucleótido de interesse. Sequências conservadas são sequências, para além das sequências fixas previamente descritas, partilhadas por parte de numerosos aptâmeros que

ligam ao mesmo alvo.

Os oligonucleótidos do conjunto incluem preferentemente uma porção de sequência randomizada bem como sequências fixas necessárias para amplificação eficaz. Tipicamente os oligonucleótidos do conjunto de partida contêm sequências terminais 5' e 3' fixas que flanqueiam uma região interna de 30-50 nucleótidos aleatórios. Os nucleótidos randomizados podem ser produzidos através de numerosas formas incluindo síntese química e seleção de tamanho a partir de ácidos nucleicos celulares clivados aleatoriamente. A variação da sequência em ácidos nucleicos de teste também pode ser introduzida ou aumentada através de mutagênese antes ou durante as interações de seleção/amplificação.

A porção de sequência aleatória do oligonucleótido pode ser de qualquer comprimento e pode compreender ribonucleótidos e/ou desoxirribonucleótidos e pode incluir nucleótidos modificados ou não naturais ou análogos de nucleótido. Veja-se, por exemplo, Patente US N° 5.958.691; Patente US N° 5.660.985; Patente US N° 5.958.691; Patente US N° 5.698.687; Patente US N° 5.817.635; Patente US N° 5.672.695, e Publicação PCT WO 92107065. Os oligonucleótidos aleatórios podem ser sintetizados a partir de nucleótidos ligados a fosfodiéster utilizando técnicas de síntese de oligonucleótido de fase sólida bem conhecidas na técnica. Veja-se, por exemplo, Froehler *et al.*, Nucl. Acid Res. 14:5399-5467 (1986) e Froehler *et al.*, Tet. Lett. 27:5575-5578 (1986). Os oligonucleótidos aleatórios também podem ser sintetizados utilizando métodos de fase de solução, tais como métodos de síntese de triéster. Veja-se, por exemplo, Sood *et al.*, Nucl. Acid Res. 4:2557 (1977) e Hirose *et al.*, Tet. Lett., 28:2449 (1978). Sínteses típicas realizadas em equipamento de síntese de ADN automatizado produzem 10^{14} - 10^{16} moléculas individuais, um número suficiente para a maioria das experiências de SELEX™.

Regiões suficientemente grandes de sequência aleatória no desenho da sequência aumentam a probabilidade de que cada molécula sintetizada seja propensa a representar uma única sequência.

A biblioteca de oligonucleótidos de partida pode ser gerada através de síntese química automatizada num sintetizador de ADN. Para sintetizar sequências aleatórias, são adicionadas misturas de todos os quatro nucleótidos a cada etapa de adição de nucleótido durante o processo de síntese, permitindo a incorporação aleatória de nucleótidos. Conforme estabelecido anteriormente, numa forma de realização, oligonucleótidos aleatórios compreendem sequências completamente aleatórias; contudo, noutras formas de realização, oligonucleótidos aleatórios podem compreender extensões de sequências não aleatórias ou parcialmente aleatórias. Podem ser criadas sequências parcialmente aleatórias adicionando os quatro nucleótidos em diferentes razões molares em cada etapa de adição.

A biblioteca de partida de oligonucleótidos pode ser ARN, ADN, ARN ou ADN substituído ou combinações dos mesmos. Nos casos onde uma biblioteca de ARN é utilizada como a biblioteca de partida esta é tipicamente gerada sintetizando uma biblioteca de ADN, opcionalmente amplificando através de PCR, posteriormente transcrevendo a biblioteca de ADN *in vitro* utilizando ARN polimerase T7 ou ARN polimerases T7 modificadas, e purificando a biblioteca transcrita. A biblioteca de ácido nucleico é então misturada com o alvo em condições favoráveis para ligação e submetidas a iterações em etapas de ligação, particionamento e amplificação, utilizando o mesmo esquema de seleção geral, para alcançar virtualmente qualquer critério desejado de afinidade e seletividade de ligação. Mais especificamente, partindo com uma mistura contendo o conjunto de partida de ácidos nucleicos, o método SELEX™ inclui as etapas de: (a) colocar a mistura em contato com o

alvo em condições favoráveis para ligação; (b) particionar ácidos nucleicos não ligados a partir dos ácidos nucleicos ligados especificamente às moléculas alvo; (c) dissociar os complexos de ácido nucleico alvo; (d) amplificar os ácidos nucleicos dissociados a partir dos complexos de ácido nucleico-alvo para produzir uma mistura enriquecida com ligando de ácidos nucleicos; e (e) reiterar as etapas de ligar, particionar, dissociar e amplificar por meio de tantos ciclos possíveis desejados para produzir ligandos de ácido nucleico altamente específicos, de alta afinidade à molécula alvo. Naqueles casos onde são selecionados aptâmeros de ARN, o método SELEX™ compreende ainda as etapas de: (i) realizar transcrição reversa dos ácidos nucleicos dissociados a partir dos complexos de ácido nucleico-alvo antes da amplificação na etapa (d); e (ii) transcrever os ácidos nucleicos amplificados a partir da etapa (d) antes de reiniciar o processo.

Dentro de uma mistura de ácido nucleico contendo um grande número de sequências e estruturas possíveis, existe uma amplo intervalo de afinidades de ligação para um dado alvo. Os que têm a maior afinidade (menores constantes de dissociação) para o alvo são mais propensos a ligar ao alvo. Após particionamento, dissociação e amplificação, é gerada uma segunda mistura de ácido nucleico, enriquecida para os maiores candidatos a afinidade de ligação. Rondas adicionais de seleção favorecem progressivamente os melhores ligandos até que a mistura de ácido nucleico resultante seja predominantemente composta por somente uma ou poucas sequências. Estas podem então ser clonadas, sequenciadas e individualmente testadas como ligandos ou aptâmeros para 1) afinidade de ligação ao alvo; e 2) capacidade de afetar a função do alvo.

Os ciclos de seleção e amplificação são repetidos até que uma meta desejada seja alcançada. Na maioria dos casos gerais, a seleção/amplificação é continuada até não ser

alcançada qualquer melhora significativa da força de ligação na repetição do ciclo. O método é tipicamente utilizado para amostrar aproximadamente 10^{14} diferentes espécies de ácido nucleico, mas pode ser utilizado para amostrar tantas como cerca de 10^{18} diferentes espécies de ácido nucleico. Geralmente, as moléculas de aptâmero de ácido nucleico são selecionadas num procedimento de 5 a 20 ciclos. Numa forma de realização, é introduzida heterogeneidade somente nos estágios de seleção inicial e não ocorre ao longo do processo de replicação.

Numa forma de realização do método SELEX™, o processo de seleção é tão eficaz no isolamento dos ligandos de ácido nucleico que ligam mais fortemente ao alvo selecionado, que somente é necessário um ciclo de seleção e amplificação. Uma tal seleção eficaz pode ocorrer, por exemplo, num processo de tipo cromatográfico em que a capacidade dos ácidos nucleicos de se associar aos alvos ligados na coluna opera de uma maneira tal que a coluna é suficientemente capaz de permitir a separação e isolamento dos ligandos de ácido nucleico de maior afinidade.

Em muitos casos, não é necessariamente desejável realizar as etapas iterativas de SELEX™ até que um único ligando de ácido nucleico seja identificado. A solução de ligando de ácido nucleico específico do alvo pode incluir uma família de estruturas ou motivos de ácidos nucleicos que têm numerosas sequências conservadas e numerosas sequências que podem ser substituídas ou adicionadas sem afetar significativamente a afinidade dos ligandos de ácido nucleico ao alvo. Através da finalização do processo SELEX™ antes da sua conclusão, é possível determinar a sequência de numerosos membros da família de solução do ligando de ácido nucleico.

É sabido que existem uma variedade de estruturas primárias, secundárias e terciárias de ácidos nucleicos. As estruturas ou motivos mostrados mais comumente como estando

envolvidos nas interações tipo não Watson-Crick são referidas como ansas em gancho, saliências simétricas e assimétricas, pseudonós e combinações infundáveis das mesmas. Quase todos os casos conhecidos de tais motivos sugerem que podem ser formados numa sequência de ácidos nucleicos de não mais do que 30 nucleótidos. Por esta razão, é frequentemente preferido que os procedimentos SELEX™ com segmentos randomizados contíguos sejam iniciados com sequências de ácidos nucleicos contendo um segmento randomizado de entre cerca de 20 a cerca de 50 nucleótidos e nalgumas formas de realização, cerca de 30 a cerca de 40 nucleótidos. Num exemplo, a sequência 5'-fixa:aleatória:3'-fixa compreende uma sequência aleatória de cerca de 30 a cerca de 50 nucleótidos.

O método de SELEX™ central foi modificado para alcançar numerosos objetivos específicos. Por exemplo, a Patente US N° 5.707.796 descreve a utilização de SELEX™ em conjunto com eletroforese em gel para selecionar moléculas de ácidos nucleicos com características estruturais específicas, tal como ADN dobrado. A Patente US N° 5.763.177 descreve métodos baseados em SELEX™ para selecionar ligandos de ácidos nucleicos contendo conjuntos fotorreativos capazes de ligar e/ou fotorreticular e/ou fotoinativar uma molécula alvo. A Patente US N° 5.567.588 e Patente US N° 5.861.254 descrevem métodos baseados em SELEX™ que alcançam particionamento altamente eficaz entre oligonucleótidos tendo alta e baixa afinidade para uma molécula alvo. A Patente US N° 5.496.938 descreve métodos para obter ligandos de ácidos nucleicos melhorados depois do processo SELEX™ ter sido realizado. A Patente US N° 5.705.337 descreve métodos para ligar covalentemente um ligando ao seu alvo.

SELEX™ também pode ser utilizado para obter ligandos de ácido nucleico que ligam a mais de um sítio na molécula alvo, e para obter ligandos de ácido nucleico que incluem

espécies de ácidos não nucleicos que ligam a locais específicos no alvo. SELEX™ proporciona meios para isolar e identificar ligandos de ácido nucleico que ligam a qualquer alvo considerável, incluindo biomoléculas grandes e pequenas, tais como proteínas de ligação a ácidos nucleicos e proteínas não conhecidas como ligando a ácidos nucleicos como parte da sua função biológica, bem como cofatores e outras moléculas pequenas. Por exemplo, a Patente US N° 5.580.737 descreve sequências de ácidos nucleicos identificadas por meio de SELEX™ que são capazes de ligar com alta afinidade à cafeína e ao análogo intimamente relacionado, teofilina.

Contra-SELEX™ é um método para melhorar a especificidade de ligandos de ácido nucleico a uma molécula alvo por meio da eliminação de sequências de ligando de ácido nucleico com reatividade cruzada com uma ou mais moléculas não alvo. Contra-SELEX™ é composto pelas etapas de: (a) preparar uma mistura candidata de ácidos nucleicos; (b) colocar a mistura candidata em contato com o alvo, em que ácidos nucleicos com uma maior afinidade para o alvo em relação à mistura candidata podem ser particionados a partir do resíduo da mistura candidata; (c) particionar os ácidos nucleicos de afinidade aumentada a partir do resíduo da mistura candidata; (d) dissociar os ácidos nucleicos de afinidade aumentada a partir do alvo; (e) colocar os ácidos nucleicos de afinidade aumentada em contato com uma ou mais moléculas não alvo, de modo a que ligandos de ácido nucleico com afinidade específica para a(s) molécula(s) não alvo sejam removidos; e (f) amplificar os ácidos nucleicos com afinidade específica somente para a molécula alvo para produzir uma mistura de ácidos nucleicos enriquecida para sequências de ácidos nucleicos com uma afinidade e especificidade relativamente maiores para ligação à molécula alvo. Conforme descrito anteriormente para SELEX™, ciclos de seleção e amplificação são repetidos conforme

necessário até que um objetivo desejado seja obtido.

Um problema potencial encontrado na utilização de ácidos nucleicos como agentes terapêuticos, de diagnóstico, e vacinas é que os oligonucleótidos na sua forma fosfodiéster podem ser rapidamente degradados em fluidos corporais por parte de enzimas intracelulares e extracelulares tais como endonucleases e exonucleases antes que o efeito desejado seja manifestado. O método SELEX™ abrange conseqüentemente a identificação de ligandos de ácido nucleico de alta afinidade contendo nucleótidos modificados conferindo características melhoradas ao ligando, tais como estabilidade *in vivo* melhorada ou características de distribuição melhoradas. Exemplos de tais modificações incluem substituições químicas nas posições de açúcar e/ou fosfato e/ou base. Ligandos de ácido nucleico identificados através de SELEX™ contendo nucleótidos modificados são descritos, por exemplo, na Patente US N° 5.660.985, que descreve oligonucleótidos contendo derivados de nucleótidos quimicamente modificados na posição 2' da ribose, posição 5 de pirimidinas e posição 8 de purinas, Patente US N° 5.756.703 que descreve oligonucleótidos contendo várias pirimidinas 2'-modificadas e Patente US N° 5.580.737 que descreve ligandos de ácidos nucleicos altamente específicos contendo um ou mais nucleótidos modificados com substituintes 2'-amino (2'-NH₂), 2'-fluoro (2'-F), e/ou 2'-O-metilo (2'-OMe).

Modificações dos ligandos de ácidos nucleicos contemplados nesta invenção incluem, mas não estão limitados a, aqueles que proporcionam outros conjuntos químicos que incorporam carga adicional, polarizabilidade, hidrofobicidade, ligações de hidrogênio, interação eletrostática, e fluxionalidade às bases de ligandos de ácido nucleico ou ao ligando de ácido nucleico como um todo. As modificações para gerar populações de oligonucleótido que são resistentes a nucleases também

podem incluir uma ou mais ligações internucleótido substitutas, açúcares alterados, bases alteradas ou combinações dos mesmos. Tais modificações incluem, mas não estão limitadas a, modificações de açúcar na posição 2', modificações de pirimidina na posição 5, modificações de purina na posição 8, modificações em aminas exocíclicas, substituição de 4-tiouridina, substituição de 5-bromo ou 5-iodo-uracilo; modificações na cadeia principal, modificações de fosforotioato ou alquil fosfato, metilações, e combinações de emparelhamento de bases pouco comuns tais como as isobases isocitidina e isoguanosina. As modificações também podem incluir modificações 3' e 5', tal como *capping*, por exemplo, adição de uma estrutura *cap* de 3'-3-dT para aumentar a resistência à exonuclease (veja-se, por exemplo, patentes U.S. 5.674.685; 5.668.264; 6.207.816; e 6.229.002).

Numa forma de realização, são proporcionados oligonucleótidos em que o grupo P(O)O é substituído por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), P(O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO ou CH₂ ("formacetal") ou 3'-amina (-NH-CH₂-CH₂-), em que cada R ou R' é independentemente H ou alquilo substituído ou não substituído. Os grupos de ligação podem ser unidos a nucleótidos adjacentes por meio de uma ligação -O-, -N-, ou -S-. Não é necessário que todas as ligações nos oligonucleótidos sejam idênticas.

Em formas de realização adicionais, os oligonucleótidos compreendem grupos açúcar modificados, por exemplo, um ou mais dos grupos hidroxilo são substituídos por halogênio, grupos alifáticos, ou funcionalizados como éteres ou aminas. Numa forma de realização, a posição 2' do resíduo de furanose é substituída por qualquer um de um grupo O-metilo, O-alquilo, O-alilo, S-alquilo, S-alilo ou halo. Métodos de síntese de açúcares 2' modificados são descritos, por exemplo, em Sproat, *et al.*, Nucl. Acid Res. 19:733-738 (1991); Cotten, *et al.*, Nucl. Acid Res. 19:2629-

2635 (1991); e Hobbs, *et al.*, *Biochemistry* 12:5138-5145 (1973). Outras modificações são conhecidas por parte de um perito na especialidade. Tais modificações podem ser modificações pré-processo SELEX™ ou modificações pós-processo SELEX™ (modificação de ligandos não modificados previamente identificados) ou podem ser realizadas através de incorporação no processo SELEX™.

As modificações pré-processo SELEX™ ou aquelas feitas através de incorporação no processo SELEX™ produzem ligandos de ácido nucleico tanto com especificidade para o seu alvo SELEX™ como estabilidade melhorada, por exemplo, estabilidade *in vivo*. As modificações pós-processo SELEX™ feitas a ligandos de ácido nucleico podem resultar em estabilidade melhorada, por exemplo, estabilidade *in vivo* sem afetar adversamente a capacidade de ligação do ligando do ácido nucleico.

O método SELEX™ abrange combinar oligonucleótidos selecionados com outras unidades funcionais de oligonucleótidos e não oligonucleótido selecionadas conforme descrito na Patente US N° 5.637.459 e Patente US N° 5.683.867. O método SELEX™ abrange adicionalmente a combinação de ligandos de ácido nucleico selecionados com compostos de elevada massa molecular lipofílicos ou não imunogénicos num complexo diagnóstico ou terapêutico, conforme descrito, por exemplo, na Patente US N° 6.011.020, Patente US N° 6.051.698, e Publicação PCT N° WO 98118480. Estas patentes e pedidos de patente ensinam a combinação de uma ampla gama de formas e outras propriedades, com as propriedades de amplificação e replicação eficazes dos oligonucleótidos, e com as propriedades desejáveis de outras moléculas.

Também foi explorada a identificação de ligandos de ácido nucleico a péptidos pequenos e flexíveis por meio do método SELEX™. Os péptidos pequenos têm estruturas flexíveis e normalmente existem em solução num equilíbrio

de múltiplos conformémeros e, conseqüentemente, foi inicialmente pensado que as afinidades de ligação podem ser limitadas por parte da entropia conformacional perdida após ligação a um péptido flexível. Contudo, a possibilidade de identificar ligandos de ácido nucleico para pequenos péptidos em solução foi demonstrada na Patente US N° 5.648.214. Nesta patente, foram identificados ligandos de ácido nucleico de ARN de alta afinidade a substância P, um péptido de 11 aminoácidos.

Os aptâmeros com especificidade e afinidade de ligação ao(s) complemento(s) alvo da presente invenção são tipicamente selecionados através do processo SELEX™ conforme descrito no presente documento. Adicionalmente, podem ser realizadas seleções com sequências incorporando nucleótidos modificados para estabilizar as moléculas de aptâmero contra a degradação *in vivo*.

SELEX™ 2' modificado

De maneira a que um aptâmero seja adequado para utilização como um agente terapêutico ou de diagnóstico, este é preferentemente barato de sintetizar, seguro e estável *in vivo*. Os aptâmeros de ARN e ADN tipo selvagem não são tipicamente estáveis *in vivo* devido à sua suscetibilidade à degradação por parte de nucleases. A resistência à degradação por parte de nucleases pode ser grandemente aumentada através da incorporação de grupos de modificação na posição 2'.

Grupos 2'-fluoro e 2'-amino foram incorporados com êxito nos conjuntos de oligonucleótidos a partir dos quais foram subseqüentemente selecionados aptâmeros. Contudo, estas modificações aumentam grandemente o custo da síntese do aptâmero resultante, e podem introduzir preocupações sobre a segurança nalguns casos, devido à possibilidade de que os nucleótidos modificados podem ser reciclados em ADN do hospedeiro através de degradação dos oligonucleótidos modificados e subseqüente utilização dos nucleótidos como

substratos para síntese de ADN.

Os aptâmeros que contêm nucleótidos 2'-O-metilo ("2'-OMe"), conforme proporcionado no presente documento, superam muitos destes inconvenientes. Os oligonucleótidos contendo nucleótidos 2-OMe são resistentes à nuclease e baratos de sintetizar. Embora os nucleótidos 2'-OMe sejam ubíquos em sistemas biológicos, as polimerases naturais não aceitam NTPs 2'-OMe como substratos sob condições fisiológicas, conseqüentemente não existem preocupações de segurança sobre a reciclagem de nucleótidos 2'-OMe no ADN do hospedeiro. Os métodos SELEX™ utilizados para gerar aptâmeros 2'-modificados são descritos, por exemplo, no Pedido de Patente Provisório US N° de Série 60/430.761, depositado a 3 de Dezembro de 2002 (documento US 2004/0197804 e documento US 2005/0037394), Pedido de Patente Provisório US N° de Série 60/487.474, depositado a 15 de Julho de 2003 (documento US 2004/0197804 e documento US 2005/0037394), Pedido de Patente Provisório US N° de Série 60/517.039, depositado a 4 de Novembro de 2003 (documento US 2004/0197804 e documento US 2005/0037394), pedido de Patente US N° 10/729.581, depositado a 3 de Dezembro de 2003 (documento US 2004/0197804 e documento US 2005/0037394), pedido de Patente US N° 10/873.856, depositado a 21 de Junho de 2004 (documento US 2004/0197804 e documento US 2005/0037394), intitulado "Method for *in vitro* Selection of 2'-O-methyl Substituted Nucleic Acids", Pedido de Patente Provisório US N° de Série 60/696.292, depositado a 30 de Junho de 2005 (documento WO 07/005645), intitulado "Improved Materials and Methods for the Generation of Fully 2'-Modified Containing Nucleic Acids Transcripts" e pedido de Patente US N° 11/480.188 (documento US 2007/0117112) depositado a 30 de Junho de 2006 intitulado "Materials and Methods for the Generation of Fully 2'-Modified Containing Nucleic Acids Transcripts".

A presente invenção inclui aptâmeros que ligam e

modulam a função de um complemento alvo que contém nucleótidos modificados (por exemplo, nucleótidos que têm uma modificação na posição 2') para tornar o oligonucleótido mais estável que o oligonucleótido não modificado à degradação enzimática e química, bem como degradação térmica e física. Numa forma de realização preferida, o dito complemento alvo é a proteína do complemento C5. Embora existam vários exemplos de 2'-OMe contendo aptâmeros na literatura (veja-se, por exemplo, Green *et al.*, *Current Biology* 2, 683-695, 1995) estes foram gerados através da seleção *in vitro* de bibliotecas de transcritos modificados em que os resíduos de C e U eram 2'-fluoro (2'-F) substituídos e os resíduos A e G eram 2'-OH. Após as sequências funcionais terem sido identificadas então cada resíduo A e G foi testado para tolerância à substituição 2'-OMe, e o aptâmero foi re-sintetizado tendo todos os resíduos A e G que toleraram substituição 2'-OMe como resíduos 2'-OMe. A maioria dos resíduos A e G de aptâmeros gerados desta maneira de duas etapas toleram substituição com resíduos 2'-OMe, embora, em média, aproximadamente 20 % não. Conseqüentemente, os aptâmeros gerados utilizando este método tendem a conter de dois a quatro resíduos de 2'-OH, e a estabilidade e custo de síntese são comprometidos como resultado. Por meio da incorporação de nucleótidos modificados na reação de transcrição que geram oligonucleótidos estabilizados utilizados em conjuntos de oligonucleótidos a partir dos quais são selecionados aptâmeros e enriquecidos através de SELEX™ (e/ou qualquer uma de a suas variações e melhorias, incluindo as descritas no presente documento), os métodos da presente invenção eliminam a necessidade de estabilizar os oligonucleótidos de aptâmeros selecionados (por exemplo, através de re-síntese dos oligonucleótidos de aptâmeros com nucleótidos modificados).

Numa forma de realização, a presente invenção

proporciona aptâmeros compreendendo combinações de modificações 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, e 2'-OMe dos nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP, e UTP. Numa outra forma de realização, a presente invenção proporciona aptâmeros compreendendo combinações de modificações 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH₂, e 2'-metoxietilo dos nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP, e UTP. Numa outra forma de realização, a presente invenção proporciona aptâmeros compreendendo 5⁶ combinações de modificações 2'-OH, 2'-F, 2'-desoxi, 2'-OMe, 2'-NH₂, e 2'-metoxietilo dos nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP, e UTP. Numa forma de realização preferida, a presente invenção proporciona aptâmeros compreendendo todos ou substancialmente todos os nucleótidos ATP, GTP, CTP, TTP, e/ou UTP 2'-OMe modificados.

Os aptâmeros 2'-modificados da invenção podem ser selecionados utilizando polimerases modificadas, por exemplo, uma polimerase T7 modificada, tendo uma taxa de incorporação de nucleótidos modificados tendo substituintes volumosos na posição 2' da furanose que é maior que a de polimerases tipo selvagem. Por exemplo, uma polimerase T7 mutante em que o resíduo de tirosina na posição 639 foi alterado a fenilalanina (Y639F) prontamente utiliza (incorpora) trifosfatos de 2'-desoxi, 2'-amino-, e 2'-fluoro-nucleótido (NTPs), mas não NTPs com substituintes 2'-volumosos, tais como substituintes 2'-OMe ou 2'-azido (2'-N₃). Para a incorporação de substituintes 2'-volumosos, uma polimerase T7 mutante tendo a histidina na posição 784 foi alterada a um resíduo de alanina além da mutação Y639F foi descrita (Y639F/H784A) e foi utilizada em circunstâncias limitadas para incorporar NTPs de pirimidina modificados. Veja-se Padilla, R. e Sousa, R., *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(24): 138. Uma ARN polimerase T7 mutante em que o resíduo de tirosina na posição 639 foi alterado a fenilalanina, o resíduo de histidina na posição 784 foi alterado a uma alanina, e o resíduo de lisina na posição

378 foi alterado a arginina (Y639F/H784A/K378R) foi utilizada em circunstâncias limitadas para incorporar NTPs de purina e pirimidina modificados, por exemplo, NTPs de 2'-OMe, mas requer um pico de GTP 2'-OH para a transcrição. Veja-se Burmeister *et al.*, (2005) *Chemistry and Biology*, 12: 25-33. Embora não se deseje ficar limitado pela teoria, a mutação K378R não está próxima do sítio ativo da polimerase e, conseqüentemente é acreditada como sendo uma mutação silenciosa, não tendo qualquer efeito na incorporação de NTPs 2'-OMe modificados. Uma polimerase T7 mutante tendo a histidina na posição 784 alterada a um resíduo de alanina (H784A) também foi descrita. Padilla *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 2002, 30: 138. Tanto na polimerase T7 mutante Y639F/H784A como mutante H784A, a alteração a um resíduo de aminoácido menor tal como alanina permite a incorporação de substratos de nucleótido mais volumosos, por exemplo, nucleótidos 2-OMe substituídos. Veja-se Chelliserry, K. e Ellington, AD., (2004) *Nature Biotech*, 9:1155-60. Foram descritas ARN polimerases T7 adicionais com mutações no sítio ativo do ARN polimerase T7 que incorporam mais prontamente substratos 2'-modificados volumosos, por exemplo, uma ARN polimerase T7 mutante tendo o resíduo de tirosina na posição 639 alterado a uma leucina (Y639L).

Geralmente, observou-se que sob as condições descritas no presente documento, o mutante Y693F pode ser utilizado para a incorporação de todos os NTPs 2'-OMe substituídos exceto GTP e as ARN polimerases T7 mutantes Y639F/H784A, Y639F/H784A/K378R, Y639L/H784A, Y639L/H784A/K378R, Y639L, Y639L/K378R, P266L/Y639L/H784A ou o mutante P266L/Y639L/H784A/K378R podem ser utilizadas sob as condições descritas no presente documento para a incorporação de todos os NTPs 2'-OMe substituídos incluindo 2'-OMe GTP.

Os oligonucleótidos 2'-modificados podem ser

sintetizados completamente a partir de nucleótidos modificados, ou com um subconjunto de nucleótidos modificados. As modificações podem ser as mesmas ou diferentes. Alguns ou todos os nucleótidos podem ser modificados e os que são modificados podem conter a mesma modificação. Alguns ou todos os nucleótidos podem ser modificados e os que são modificados podem conter modificações diferentes, por exemplo, todos os nucleótidos contendo a mesma base podem ter um tipo de modificação, enquanto nucleótidos contendo outras bases podem ter tipos diferentes de modificação. Todos os nucleótidos de purina podem ter um tipo de modificação (ou são não modificados), enquanto todos os nucleótidos de pirimidina têm outro tipo diferente de modificação (ou são não modificados). Desta maneira, transcritos ou conjuntos de transcritos são gerados utilizando qualquer combinação de modificações, incluindo por exemplo, ribonucleótidos (2-OH), desoxirribonucleótidos (2-desoxi), nucleótidos 2-amino (2'-M₂), nucleótidos 2'-fluoro (2'-F), e nucleótidos 2'-OH-metilo (2'-OMe). Uma mistura de transcrição contendo A e G 2'-OH e C e U 2' F é referida como uma mistura de "rRfY" e aptâmeros selecionados a partir da mesma são referidos como aptâmeros "rRfY". Uma mistura de transcrição contendo C e U 2'-OMe e A e G 2'-OH é referida como uma mistura "rRmY" e aptâmeros selecionados a partir da mesma são referidos como aptâmeros "rRmY". Uma mistura de transcrição contendo desoxi A e G e U e C 2'-OMe é referida como uma mistura "dRmY" e aptâmeros selecionados a partir da mesma são referidos como aptâmeros "dRmY". Uma mistura de transcrição contendo A, C, e U 2'-OMe, e G 2'-OH é referida como uma mistura "rGmH" e aptâmeros selecionados a partir da mesma são referidos como aptâmeros "rGmH". Uma mistura de transcrição alternativamente contendo A, C, U e G 2'-OMe e A, U e C 2'-OMe e G 2'-F é referida como uma "mistura alternante" e aptâmeros selecionados a partir da mesma são referidos como

aptâmeros de "mistura alternante". Uma mistura de transcrição contendo A, U, C, e G 2'-OMe, onde até 10 % dos G's são ribonucleótidos é referida como uma mistura "r/mGmH" e aptâmeros selecionados a partir da mesma são referidos como aptâmeros "r/mGmH". Uma mistura de transcrição contendo A, U, e C 2'-OMe, e G 2'-F é referida como uma mistura "fGmH" e aptâmeros selecionados a partir da mesma são referidos como aptâmeros "fGmH". Uma mistura de transcrição contendo A, U, e C 2'-OMe, e desoxi G é referida como uma mistura "dGmH" e aptâmeros selecionados a partir da mesma são referidos como aptâmeros "dGmH". Uma mistura de transcrição contendo desoxi A, e C, G e U 2'-OMe é referida como uma mistura "dAmB" e aptâmeros selecionados a partir da mesma são referidos como aptâmeros "dAmB", e uma mistura de transcrição contendo todos os nucleótidos 2'-OH é referida como uma mistura "rN" e aptâmeros selecionados a partir da mesma são referidos como aptâmeros "rN", "rRrY" ou "ARN". Uma mistura de transcrição contendo adenosina trifosfato 2'-OH e guanosina trifosfato e desoxi citidina trifosfato e timidina trifosfato é referida como uma mistura rRdY e aptâmeros selecionados a partir da mesma são referidos como aptâmeros "rRdY". Um "mRmY" também referido como um aptâmero "MNA" é um contendo somente nucleótidos de metilo 2'-O-, exceto para o nucleótido de partida, que é guanosina 2'-OH ou qualquer guanosina de tipo selvagem, e pode ser derivado a partir de um oligonucleótido r/mGmH através de substituição pós-SELEX™, quando possível, de qualquer Gs 2'-OH por Gs 2'-OMe. Alternativamente, os aptâmeros mRmY podem ser identificados através SELEX™ de mRmY.

Uma forma de realização preferida inclui qualquer combinação de nucleótidos 2'-OH, 2'-desoxi e 2'-OMe. Uma forma de realização mais preferida inclui qualquer combinação de nucleótidos 2'-desoxi e 2'-OMe. Uma forma de realização ainda mais preferida é com qualquer combinação

de nucleótidos 2-desoxi e 2'-OMe em que as pirimidinas são 2'-OMe (tais como dRmY, mRmY ou dGmH).

A incorporação de nucleótidos modificados em aptâmeros da invenção é acompanhada antes (pré-) do processo de seleção (por exemplo, uma modificação do processo pré-SELEX™). Opcionalmente, os aptâmeros da invenção em que nucleótidos modificados foram incorporados por processo de modificação pré-SELBX™ podem ser adicionalmente modificados por um processo de modificação pós-SELEX™ (isto é, um processo de modificação pós- SELEX™ depois de SELEX™). Processos de modificação pré-SELEX™ produzem ligandos de ácido nucleico modificados com especificidade para o alvo SELEX™ e também melhor estabilidade *in vivo*. Processo de modificação pós- SELEX™, isto é, modificação (por exemplo, truncagem, deleção, substituição ou modificações adicionais de nucleótido dos ligandos previamente identificados com nucleótidos incorporados por processo de modificação pré-SELEX™) pode resultar numa melhoria adicional da estabilidade *in vivo* sem afetar adversamente a capacidade de ligação do ligando de ácido nucleico com nucleótidos incorporados pelo processo de modificação pré-SELEX™.

Para gerar conjuntos de transcritos de ARN 2'-modificadas (por exemplo, 2'-OMe) em condições sob as quais uma polimerase aceita NTPs 2'-modificados as ARN polimerases T7 mutantes Y693F, Y693F/K378R, Y693F/H784A, Y693F/H784A/K378R, Y693L/H784A, Y693L/H784A/K378R, Y639L, Y639L/K378R, P266L/Y639L/H784A e P266L/Y639L/H784A/K378R podem todas ser utilizadas. Outras ARN polimerases T7, particularmente as que exibem uma alta tolerância para substituintes 2'- volumosos, também podem ser utilizadas na presente invenção. Quando utilizadas numa polimerização direcionada por molde utilizando as condições divulgadas no presente documento, a ARN polimerase T7 mutante Y639L/H784A, Y639L/H784A/K378R, P266L/Y639L/H784A ou P266L/Y639L/H784A/ K378R pode ser utilizada para a

incorporação de todos os NTPs 2'-OMe, incluindo GTP 2'-OMe, com maiores rendimentos de transcrição que do que os obtidos utilizando as ARN polimerases T7 mutantes Y639F, Y639F/K378R, Y639F/H784A, Y639F/H784A/K378R, Y639L, Y639L/K378R. As ARN polimerases T7 mutantes Y639L/H784A, Y639L/H784A/K378R, P266L/Y639L/H784A e P266L/Y639L/H784A/K378R podem ser utilizadas, mas não requerem, com GTP 2'-OH para alcançar altos rendimentos de oligonucleótidos 2'-modificados, por exemplo, contendo 2'-OMe.

Outras polimerases, particularmente aquelas que exibem uma alta tolerância a substituintes 2'- volumosos, também podem ser utilizadas na presente invenção. Tais polimerases podem ser rastreadas para esta capacidade por meio do ensaio da sua capacidade de incorporar nucleótidos modificados sob as condições de transcrição divulgadas no presente documento.

Numerosos fatores foram determinados como sendo importantes para as condições de transcrição úteis nos métodos divulgados no presente documento. Por exemplo, uma sequência líder incorporada na sequência fixa no terminal 5' de um molde de transcrição de ADN pode ser importante para aumentar os rendimentos de transcritos modificados quando as ARN polimerases T7 mutantes Y639F/K378R ou Y639F/H784A/K378R são utilizadas para transcrição, por exemplo, sob as condições de transcrição de dRmY ou r/mGmH descritas abaixo. Adicionalmente, uma sequência líder pode ser utilizada, mas não é necessária para ajudar a aumentar o rendimento dos transcritos modificados quando, por exemplo, a ARN polimerase T7 mutante Y639L/H784A ou Y639L/H784A/K378R é utilizada para transcrição, por exemplo, sob as condições de transcrição de mRmY descritas abaixo. A sequência líder tem tipicamente 6-15 nucleótidos de comprimento e pode ser composta por todas as purinas, ou uma mistura de nucleótidos de purina e pirimidina.

Outro fator importante na obtenção de transcritos

incorporando nucleótidos modificados é a presença ou concentração de guanosina 2'-OH (por exemplo, GMP, GTP, ou outro não-trifosfato não-2'-OMe). A transcrição pode ser dividida em duas fases: a primeira fase é a iniciação, durante a qual um NTP é adicionado à extremidade 3-hidroxilo de GTP (ou GMP, ou outro não trifosfato não 2'-OMe) para render um dinucleótido que é então estendido em até 10-12 nucleótidos; a segunda fase é a elongação, durante a qual a transcrição procede além da adição dos primeiros cerca de 10-12 nucleótidos. Foi constatado que pequenas quantidades de GTP 2'-OH (ou GMP, ou outro não trifosfato não 2'-OMe) adicionadas a uma mistura de transcrição contendo um excesso de GTP 2'-OMe são suficientes para permitir que a polimerase inicie a transcrição utilizando GTP 2'-OH (ou GMP, guanosina, ou outro não trifosfato não 2'-OMe). Conseqüentemente, por exemplo, uma mistura de transcrição de dRmY (contendo desoxipurinas e pirimidinas 2'OMe) requer a adição de uma pequena quantidade de GMP para permitir que a polimerase inicie a transcrição, enquanto numa mistura de transcrição r/mGmH (contendo até 10 % de GTP 2'-OH), uma pequena quantidade de GMP pode ser adicionada à mistura de transcrição, mas não é requerida para permitir que a polimerase inicie a transcrição, já que o GTP 2'-OH já se encontra presente na mistura de transcrição. Após que a transcrição ter entrado na fase de alongamento, a discriminação reduzida entre GTP 2'-OMe e 2'-OH, e o excesso de GTP 2'-OMe sobre GTP 2'-OH permite a incorporação principalmente do GTP 2'-OMe.

Conforme descrito imediatamente antes, iniciar a transcrição com guanosina 2'-OH (por exemplo, GMP, GTP ou outro não trifosfato não-2'-OMe) é importante. Este efeito resulta da especificidade da polimerase para o nucleótido de iniciação. Como resultado, o nucleótido 5-terminal de qualquer transcrito gerado desta maneira é propenso a ser G

2-OH. A concentração preferida de GMP é 0,5 mM e ainda mais preferentemente 1 mM. Também foi constatado que a inclusão de PEG, preferentemente PEG-8000, na reação de transcrição é útil para maximizar a incorporação de nucleótidos modificados.

Outro fator importante na incorporação de nucleótidos 2'-OMe substituídos em transcritos é a utilização tanto de magnésio como de manganésio divalente na mistura de transcrição. Foi constatado que combinações de concentração diferentes de cloreto de magnésio e cloreto de manganésio afetam os rendimentos de transcritos 2'-O-metilados, a concentração ideal do cloreto de magnésio e manganésio dependendo da concentração na mistura da reação de transcrição de NTPs que complexam iões metálicos divalentes. Para obter os maiores rendimentos de todas os transcritos 2'-O-metilados (isto é, todos os A, C, e U 2'-OMe e cerca de 90 % de nucleótidos G), concentrações de aproximadamente 5 mM de cloreto de magnésio e 1,5 mM de cloreto de manganésio são preferidas quando cada NTP está presente a uma concentração de 0,5 mM. Quando a concentração de cada NTP é 1,0 mM, concentrações de aproximadamente 6,5 mM de cloreto de magnésio e 2,0 mM de cloreto de manganésio são preferidas. Quando a concentração de cada NTP for 2,0 mM, concentrações de aproximadamente 9,6 mM de cloreto de magnésio e 2,9 mM de cloreto de manganésio são preferidas. Em qualquer caso, desvios a partir destas concentrações de até duas vezes ainda dão quantidades significativas de transcritos modificados.

Nalguma forma de realização é vantajoso iniciar a transcrição com GMP ou guanossina. Este efeito resulta a partir da especificidade da polimerase para o nucleótido de iniciação. Como resultado, o nucleótido 5'-terminal de qualquer transcrição gerado desta maneira é propenso a ser G 2-OH. A concentração preferida de GMP (ou guanossina) é 0,5 mM e ainda mais preferentemente 1 mM. Também Foi

constatado que a inclusão de PEG, preferentemente PEG-8000, na reação de transcrição é útil para maximizar a incorporação de nucleótidos modificados.

Para a incorporação máxima de ATP (100 %), UTP (100 %), CTP (100 %) e GTP (~90%) 2'-OMe ("r/mGmH") nos transcritos as seguintes condições são preferidas: tampão HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 5 mM (6,5 mM onde a concentração de cada NTP 2'-OMe é 1,0 mM), MgCl₂ 1,5 mM (2,0 mM onde a concentração de cada NTP 2'-OMe é 1,0 mM), NTP 2'-OMe (cada) 500 µM (mais preferentemente, 1,0 mM), GTP 2'-OH 30 µM, GMP 2'-OH 500 µM, pH 7,5, ARN polimerase T7 Y639F/H784A 15 unidades/ml, pirofosfatase inorgânica 5 unidades/ml, e um sequência líder totalmente de purina de pelo menos 8 nucleótidos de comprimento. Conforme utilizado no presente documento, uma unidade da ARN polimerase T7 mutante Y639F/H784A (ou qualquer outra ARN polimerase T7 mutante especificada no presente documento) é definida como a quantidade de enzima necessária para incorporar 1 nmol de NTPs 2'-OMe nos transcritos sob as r/mGmH de condições. Conforme utilizado no presente documento, uma unidade de pirofosfatase inorgânica é definida como a quantidade de enzima que libertará 1,0 mol de ortofosfato inorgânico por minuto a pH 7,2 e 25 °C.

Para a incorporação máxima (100 %) de GTP 2'-OH e OMe ATP, UTP e CTP 2'- ("rGmH") nos transcritos as seguintes condições são preferidas: tampão HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 5 mM (9,6 mM onde a concentração de cada NTP é 2,0 mM), MnCl₂ 1,5 mM (2,9 mM onde a concentração de cada NTP é 2,0 mM), NTP (cada) 500 µM (mais preferentemente, 2,0 mM), GMP 2'-OH 1 mM, pH 7,5, ARN polimerase T7 Y639F/K378R 200 nM, pirofosfatase inorgânica 5 unidades/ml, e numa sequência líder totalmente de purina de pelo menos 8 nucleótidos de comprimento.

Para a incorporação máxima de ATP 2'-OMe (100 %), UTP 2'-OMe (100 %), CTP 2'-OMe (100 %) e GTP 2'-OMe (100 %) ("mRmY" ou "MNA") nos transcritos as seguintes condições são preferidas: tampão HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 8 mM, MnCl₂ 2,5 mM, NTP 2'-OMe (cada) 1,5 mM, GMP 2'-OH 1 mM, pH 7,5, ARN polimerase T7 mutante Y639L/H784A/K378R 200 nM, pirofosfatase inorgânica 5 unidades/ml, e uma sequência líder opcional que aumenta o rendimento da transcrição sob as condições de transcrição derivadas. Numa forma de realização, a sequência líder opcional é uma sequência líder totalmente de purina. Noutra forma de realização, a sequência líder opcional é uma mistura de purinas e pirimidinas.

Para a incorporação máxima (100 %) de ATP e GTP 2'-OH, e UTP e CTP 2'-OMe ("r-RmY") nos transcritos as seguintes condições são preferidas: tampão HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 5 mM (9,6 mM onde a concentração de cada NTP é 2,0 mM), MgCl₂ 1,5 mM (2,9 mM onde a concentração de cada NTP é 2,0 mM), NTP (cada) 500 µM (mais preferentemente, 2,0 mM), GMP 2'-OH 1 mM, pH 7,5, ARN polimerase T7 Y639F/H784A/K378R 200 nM, pirofosfatase inorgânica 5 unidades/ml, e uma sequência líder totalmente de purina de pelo menos 8 nucleótidos de comprimento.

Para a incorporação máxima (100 %) de ATP, UTP e CTP 2'-OMe ("rGmH") nos transcritos as seguintes condições são preferidas: tampão HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X 0,01 % (p/v), MgCl₂ 5 mM (9,6 mM onde a concentração de cada NTP 2'-OMe é 2,0 mM), MnCl₂ 1,5 mM (2,9 mM quando a concentração de cada NTP 2'-OMe é 2,0 mM), NTP 2'-OMe (cada) 500 mM (mais preferentemente, 2,0 mM), pH 7,5, ARN polimerase T7 Y639F 15 unidades/ml, pirofosfatase inorgânica 5 unidades/ml e uma sequência líder totalmente de purina de pelo menos 8

nucleótidos de comprimento.

Para a incorporação máxima (100 %) de UTP e CTP 2'-OMe ("rRmY') nos transcritos as seguintes condições são preferidas: tampão HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 5 mM (9,6 mM onde a concentração de cada NTP 2'-OMe é 2,0 mM), MnCl₂ 1,5 mM (2,9 mM onde a concentração de cada NTP 2'-OMe é 2,0 mM), NTP 2'-OMe (cada) 500 mM (mais preferentemente, 2,0 mM), pH 7,5, ARN polimerase T7 Y639F/H784A 15 unidades/ml, pirofosfatase inorgânica 5 unidades/ml, e uma sequência líder totalmente de purina de pelo menos 8 nucleótidos de comprimento.

Para a incorporação máxima (100 %) de desoxi ATP e GTP e UTP e CTP 2'-OMe ("dRrY") nos transcritos as seguintes condições são preferidas: tampão HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermina 2 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 9,6 mM, MnCl₂ 2,9 mM, NTP (cada) 2,0 mM, GMP 2'-OH 1 mM, pH 7,5, Y639F1K3787R ARN polimerase T7 200 nM, pirofosfatase inorgânica 5 unidades/ml, e uma sequência líder totalmente de purina de pelo menos 8 nucleótidos de comprimento.

Para a incorporação máxima (100 %) de ATP, UTP e CTP 2'-OMe e GTP 2'-F ("fGmH") nos transcritos as seguintes condições são preferidas: tampão HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 mM, PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 9,6 mM, MnCl₂ 2,9 NTP 2'-OMe (cada) 2,0 mM, GMP 2'-OH 1 mM, pH 7,5, ARN polimerase T7 Y639F/K378R 200 nM, pirofosfatase inorgânica 5 unidades/ml, e uma sequência líder totalmente de purina de pelo menos 8 nucleótidos de comprimento.

Para a incorporação máxima (100 %) de desoxi ATP e UTP, GTP e CTP 2'-OMe nos transcritos as seguintes condições são preferidas: tampão HEPES 200 mM, DTT 40 mM, espermidina 2 PEG-8000 10 % (p/v), Triton X-100 0,01 % (p/v), MgCl₂ 9,6 mM, MnCl₂ 2,9 mM, NTP (cada) 2,0 mM, GMP

2'-OH 1 mM, pH 7,5, ARN polimerase T7 Y639F/K378R 20, pirofosfatase inorgânica 5 unidades/ml, e uma sequência líder totalmente de purina de pelo menos 8 nucleótidos de comprimento.

Para cada uma dos transcritos anteriores (a) a transcrição é preferentemente realizada a uma temperatura de desde cerca de 20 °C até cerca de 50 °C, preferentemente desde cerca de 30 °C até cerca de 45 °C, e mais preferentemente a cerca de 37 °C durante um período de pelo menos duas horas e (b) são utilizados 50-300 nM de um molde de transcrição de ADN de cadeia dupla (é utilizado um molde 200 nM na ronda 1 para aumentar a diversidade (é utilizado um molde de 300 nM nos transcritos dRmY)), e para as rondas subsequentes são utilizados aproximadamente 50 nM, uma diluição 1/10 de uma reação de PCR otimizada, utilizando as condições descritas no presente documento). Os moldes de transcrição de ADN preferidos são descritos abaixo (onde ARC254 e ARC256 5 transcrevem em todas as condições 2'-OME e ARC255 transcreve em condições rRmY).

ARC 254 SEQ ID NO: 99

5'-CATCGATGCTAGTCGTAACGATCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTG
AGTCGTATTA-3'

ARC 255 SEQ ID NO: 100

5'-CATGCATCGCGACTGACTAGCCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTG
AGTCGTATTA-3'

ARC 256 SEQ ID NO: 101

5'-CATCGATCGATCGATCGACAGCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTG
AGTCGTATTA-3'

Em condições de transcrição rN, a mistura da reação de transcrição compreende adenosinas trifosfato (ATP) 2'-OH, guanosinas trifosfato (GTP) 2'-OH, citidinas trifosfato (CTP) 2'-OH, e uridinas trifosfato (UTP) 2'-OH. Todos os oligonucleótidos modificados produzidos utilizando as misturas de transcrição rN da presente invenção compreendem substancialmente adenosina 2'-OH, guanosina 2'-OH, citidina 2'-OH, e uridina 2'-OH. Numa forma de realização preferida da transcrição rN, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-OH,

pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-OH, pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de citidina são citidina 2'-OH, e pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de uridina são uridina 2'-OH. Numa forma de realização mais preferida de transcrição rN, os oligonucleótidos modificados resultantes da presente invenção compreendem uma sequência onde pelo menos 90 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-OH, pelo menos 90 % de todos os nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-OH, pelo menos 90 % de todos os nucleótidos de citidina são citidina 2'-OH, e pelo menos 90 % de todos os nucleótidos de uridina são uridina 2'-OH. Numa forma de realização mais preferida da transcrição rN, os oligonucleótidos modificados da presente invenção compreendem uma sequência onde 100 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-OH, 100 % de todos os nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-OH, 100 % de todos os nucleótidos de citidina são citidina 2'-OH, e 100 % de todos os nucleótidos de uridina são uridina 2'-OH.

Sob condições de transcrição rRmY, a mistura da reação de transcrição compreende adenosinas trifosfato 2'-OH, guanosinas trifosfato 2'-OH, citidinas trifosfato 2'-OMe, e uridina trifosfato 2'-OMe. Os oligonucleótidos modificados produzidos utilizando as misturas de transcrição rRmY da presente invenção compreendem substancialmente totalmente adenosina 2'-OH, guanosina 2'-OH, citidina 2'-OMe e uridina 2'-OMe. Numa forma de realização preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-OH, pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-OH, pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de citidina são citidina 2'-OMe e pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de uridina são uridina 2'-OMe. Numa forma de realização mais preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma

sequência onde pelo menos 90 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-OH, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-OH, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-OMe e pelo menos 90 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-OMe. Numa forma de realização acima de tudo preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde 100 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-OH, 100 % de todos nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-OH, 100 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-OMe e 100 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-OMe.

Sob condições de transcrição dRmY, a mistura da reação de transcrição compreende 2'-desoxi adenosinas trifosfato, 2'-desoxi guanosinas trifosfato, citosinas trifosfato 2-O-metilo e uridinas trifosfato 2-O-metilo. Os oligonucleótidos modificados produzidos utilizando as condições de transcrição dRmY da presente invenção compreendem substancialmente totalmente 2'-desoxi adenosina, 2'-desoxi guanosina, citidina 2'-O-metilo, e uridina 2'-O-metilo. Numa forma de realização preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes da presente invenção compreendem uma sequência onde pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de adenosina são 2'-desoxi adenosina, pelo menos 80 % de todos nucleótidos de guanosina são 2'-desoxi guanosina, pelo menos 80 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, e pelo menos 80 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo. Numa forma de realização mais preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes da presente invenção compreendem uma sequência onde pelo menos 90 % de todos os nucleótidos de adenosina são 2'-desoxi adenosina, pelo menos 90 % de todos os nucleótidos de guanosina são 2'-desoxi guanosina, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, e pelo menos 90 % de todos

nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo. Numa forma de realização acima de tudo preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes da presente invenção compreendem uma sequência onde 100 % de todos os nucleótidos de adenosina são 2'-desoxi adenosina, 100 % de todos nucleótidos de guanossina são 2'-desoxi guanossina, 100 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, e 100 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo.

Sob condições de transcrição rGmH, a mistura da reação de transcrição compreende guanossinas trifosfato 2'-OH, citidinas trifosfato 2'-OMe, uridina trifosfato 2'-OMe, e adenosinas trifosfato 2'-O-Me. Os oligonucleótidos modificados produzidos utilizando as misturas de transcrição rGmH da presente invenção compreendem substancialmente totalmente guanossina 2'-OH, citidina 2'-OMe, uridina 2'-OMe, e adenosina 2'-OMe. Numa forma de realização preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde pelo menos 80 % de todos nucleótidos de guanossina são guanossina 2'-OH, pelo menos 80 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-OMe, pelo menos 80 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-OMe, e pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-OMe. Numa forma de realização mais preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde pelo menos 90 % de todos nucleótidos de guanossina são guanossina 2'-OH, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-OMe, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-OMe, e pelo menos 90 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-OMe. Numa forma de realização acima de tudo preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde 100 % de todos nucleótidos de guanossina são guanossina 2'-OH, 100 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2' - OMe, 100 %

de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'- OMe e 100 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-O-metilo.

Sob condições de transcrição r/mGmH, a mistura da reação de transcrição compreende adenosina trifosfato 2'-O-metilo, citidina trifosfato 2'-O-metilo, guanosina trifosfato 2'-O-metilo, uridina trifosfato 2'-O-metilo e guanosina trifosfato 2'-OH. Os oligonucleótidos modificados resultantes produzidos utilizando as misturas de transcrição r/mGmH da presente invenção compreendem substancialmente totalmente adenosina 2'-O-Metilo, citidina 2'-O-metilo, guanosina 2'-O-metilo, e uridina 2'-O-metilo, em que a população de nucleótidos de guanosina tem um máximo de cerca de 10 % de guanosina 2'-OH. Numa forma de realização preferida, os oligonucleótidos modificados r/mGmH resultantes da presente invenção compreendem uma sequência onde pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-O-metilo, pelo menos 80 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, pelo menos 80 % de todos nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-metilo, pelo menos 80 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo, e não mais do que cerca de 10 % de todos nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-OH. Numa forma de realização mais preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde pelo menos 90 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-O-metilo, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-O-metilo, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo, e não mais do que cerca de 10 % de todos nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-OH. Numa forma de realização acima de tudo preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde 100 % de todos os nucleótidos de adenosina

são adenosina 2'-O-metilo, 100 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, 90 % de todos nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-O-metilo e 100 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo, e não mais do que cerca de 10 % de todos nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-OH.

Em condições de transcrição mRmY (também referida no presente documento como MNA), a mistura de transcrição compreende somente adenosina trifosfato 2'-O-metilo, citidina trifosfato 2'-O-metilo, guanosina trifosfato 2'-O-metilo, uridina trifosfato 2'-O-metilo. Os oligonucleótidos modificados resultantes produzidos utilizando a mistura de transcrição mRmY da presente invenção compreendem uma sequência onde 100 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-O-Metilo, 100 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, 100 % de todos nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-O-metilo (exceto para a primeira guanosina do oligonucleótido), e 100 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo.

Em condições de transcrição fGmH, a mistura da reação de transcrição compreende adenosinase trifosfato 2'-O-metilo, uridinas trifosfato 2'-O-metilo, citidina trifosfato 2'-O-metilo, e guanosinas trifosfato 2'-F. Os oligonucleótidos modificados produzidos utilizando as condições de transcrição fGmH da presente invenção compreendem substancialmente totalmente adenosina 2'-O-metilo, uridina 2'-O-metilo, citidina 2'-O-metilo, e guanosina 2'-F. Numa forma de realização preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-O-Metilo, pelo menos 80 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo, pelo menos 80 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, e pelo menos 80 % de todos nucleótidos de

guanossina são guanossina 2'-F. Numa forma de realização mais preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde pelo menos 90 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-O-metilo, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, e pelo menos 90 % de todos nucleótidos de guanossina são guanossina 2'-F. Numa forma de realização mais preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde 100 % de todos os nucleótidos de adenosina são adenosina 2'-O-metilo, 100 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo, 100 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, e 100 % de todos nucleótidos de guanossina são guanossina 2'-F.

Em condições de transcrição dAmB, fosfatos, citidina trifosfato 2'-O-metilo, guanossinas trifosfato 2'-O-metilo, e uridinas trifosfato 2'-O-metilo. Os oligonucleótidos modificados produzidos utilizando as misturas de transcrição dAmB da presente invenção compreendem substancialmente totalmente 2'-desoxi adenosina, citidina 2'-O-metilo, guanossina 2'-O-metilo, e uridina 2'-O-metilo. Numa forma de realização preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde pelo menos 80 % de todos os nucleótidos de adenosina são 2'-desoxi adenosina, pelo menos 80 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, pelo menos 80 % de todos nucleótidos de guanossina são guanossina 2'-O-metilo, e pelo menos 80 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo. Numa forma de realização mais preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes compreendem uma sequência onde pelo menos 90 % de todos os nucleótidos de adenosina são 2'-desoxi adenosina, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, pelo menos 90 % de todos nucleótidos de guanossina são guanossina

2'-O-metilo, e pelo menos 90 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo. Numa forma de realização mais preferida, os oligonucleótidos modificados resultantes da presente invenção compreendem uma sequência onde 100 % de todos os nucleótidos de adenosina são 2'-desoxi adenosina, 100 % de todos os nucleótidos de citidina são citidina 2'-O-metilo, 100 % de todos nucleótidos de guanosina são guanosina 2'-O-metilo, e 100 % de todos nucleótidos de uridina são uridina 2'-O-metilo.

Em cada caso, os produtos de transcrição podem então ser utilizados como a biblioteca no processo SELEX™ para identificar aptâmeros e/ou para determinar um motivo conservado de sequências que têm especificidade de ligação a um dado alvo. As sequências resultantes já se encontram estabilizadas, eliminando esta etapa a partir do processo para chegar a uma sequência de aptâmeros estabilizada e dando um aptâmero altamente estabilizado como resultado. Outra vantagem do processo SELEX™ de 2'-OME é que as sequências resultantes são propensas a ter menos nucleótidos 2-OH requeridos na sequência, possivelmente nenhum. Até ao ponto em que os nucleótidos 2'OH permanecem estes podem ser removidos realizando modificações pós-SELEX™.

Conforme descrito abaixo, podem ser obtidos rendimentos baixos, mas ainda úteis de transcritos incorporando completamente nucleótidos 2' substituídos em condições para além das condições otimizadas descritas acima. Por exemplo, variações das condições de transcrição acima incluem:

A concentração de tampão HEPES pode variar de 0 a 1 M. A presente invenção também contempla a utilização de outros agentes de tamponamento com um pKa entre 5 e 10 incluindo, por exemplo, Tris(hidroximetil)aminometano.

A concentração de DTT pode variar de 0 a 400 mM. Os métodos da presente invenção também proporcionam a

utilização de outros agentes de redução incluindo, por exemplo, mercaptoetanol.

A concentração de espermidina e/ou espermina pode variar de 0 a 20 mM.

A concentração de PEG-8000 pode variar de 0 a 50 % (p/v). Os métodos da presente invenção também proporcionam a utilização de outros polímeros hidrofílicos incluindo, por exemplo, outros PEG de massa molecular ou outros polialquilenoglicóis.

A concentração de Triton X-100 pode variar de 0 a 0,1 % (p/v). Os métodos da presente invenção também proporcionam utilização de outros detergentes não iônicos incluindo, por exemplo, outros detergentes, incluindo outros detergentes de Triton-X.

A concentração de $MgCl_2$ pode variar de 0,5 mM a 50 mM. A concentração de $MnCl_2$ pode variar de 0,15 mM a 15 mM. Tanto $MgCl_2$ como $MnCl_2$ devem estar presentes dentro dos intervalos descritos e numa forma de realização preferida estão presentes numa razão de cerca de 10 a cerca de 3 de $MgCl_2:MnCl_2$, preferentemente, a razão é cerca de 3-5:1, mais preferentemente, a razão é cerca de 3-4:1.

A concentração de NTP 2'-OMe (cada NTP) pode variar de 5 μM a 5 mM.

A concentração de GTP 2'-OH pode variar de 0 μM a 300 μM . Nalgumas formas de realização, a transcrição ocorre na ausência de GTP 2'-OH (0 μM)

A concentração de GMP 2'-OH, guanosina ou outros G 2'-OH substituídos numa posição para além da posição 2' açúcar, pode variar de 0 a 5 mM e onde, nalgumas formas de realização, GTP 2'-OH não está incluído na reação GMP 2'-OH é requerido e pode variar de 5 μM a 5 mM.

A concentração do molde de ADN pode variar de 5 nM a 5 μM .

A concentração de polimerase mutante pode variar de 2nM a 20 μM .

A pirofosfatase inorgânica pode variar de 0 a 100 unidades/ml.

O pH pode variar de pH 6 a pH 9. Os métodos da presente invenção podem ser praticados dentro do intervalo de pH de atividade da maioria das polimerases que incorporam nucleótidos modificados.

A reação de transcrição pode ser deixada ocorrer desde cerca de uma hora até semanas, preferentemente desde cerca de 1 até cerca de 24 horas.

Os aptâmeros selecionados tendo a maior afinidade e ligação específicas, conforme demonstrado através de ensaios biológicos conforme descrito nos exemplos abaixo são agentes terapêuticos adequados para tratar condições em que a proteína do complemento C5 está envolvida na patogênese.

QUÍMICA MEDICINAL DO APTÂMERO

Uma vez que os aptâmeros que ligam a um alvo desejado são identificados, podem ser opcionalmente realizadas várias técnicas para aumentar adicionalmente as características de ligação e/ou funcionais da sequências de aptâmeros identificadas. Os aptâmeros que ligam a um alvo desejado identificado por meio do processo SELEX™ (incluindo SELEX™ 2'Modificado) podem ser opcionalmente truncados para obter a sequência de aptâmeros mínima (também referida no presente documento como "construção minimizada") tendo as características de ligação e/ou funcionais desejadas. Um método para conseguir isto é utilizando programas de dobragem e análise de sequência (por exemplo, sequências clone de alinhamento resultantes a partir de uma seleção para procurar motivos conservados e/ou covariação) para atualizar o desenho de construções minimizadas. Também podem ser realizadas experiências de sondagem bioquímicas para determinar os limites 5' e 3' de uma sequência de aptâmeros para atualizar o desenho de construções minimizadas. As construções minimizadas podem

então ser quimicamente sintetizadas e testadas para características de ligação e funcionais em comparação com a sequência não minimizada a partir da qual foram derivadas. Variantes de uma sequência de aptâmeros contendo uma série de eliminações 5', 3' e/ou internas também podem ser sintetizadas quimicamente de forma direta e testadas para características de ligação e/ou funcionais em comparação com a sequência de aptâmeros não minimizada a partir da qual foram derivadas.

Adicionalmente, podem ser utilizadas re-seleções dopadas para explorar os requisitos da sequência numa sequência de aptâmeros ativa simples (isto é, um aptâmero que liga a um alvo desejado identificado por meio do processo SELEX™, (incluindo SELEX™ 2' modificado), ou uma única sequência de aptâmeros minimizada. São realizadas re-seleções dopadas utilizando um conjunto sintético, degenerados que foi desenhado com base na sequência única de interesse. O nível de degeneração normalmente varia 70 % a 85 % a partir do nucleótido de tipo selvagem, isto é, a sequência única de interesse. Em geral, são identificadas sequências com mutações neutras por meio do processo de re-seleção dopada, mas nalguns casos as alterações na sequência podem resultar em melhorias na afinidade. A informação de sequência composta a partir dos clones identificados utilizando re-seleções dopadas pode então ser utilizada para identificar o motivo de ligação mínimo e auxiliar nos esforços de otimização.

Sequências de aptâmeros identificadas utilizando o processo SELEX™ (incluindo SELEX™ 2' modificado e re-seleções dopadas) e/ou sequências de aptâmeros minimizadas podem também ser opcionalmente otimizados pós SELEX™ utilizando química Medicinal de Aptâmero para realizar mutagênese aleatória ou direcionada da sequência para aumentar a afinidade de ligação e/ou características funcionais, ou alternativamente para determinar que

posições na sequência são essenciais para as características de afinidade ligação e/ou funcionais.

A química medicinal de aptâmero é uma técnica de melhoria de aptâmeros em que conjuntos de aptâmeros variantes são quimicamente sintetizados. Os conjuntos de variantes tipicamente diferem do aptâmero parental através da introdução de um único substituinte, e diferem entre si através da localização deste substituinte. Estas variantes são então comparadas entre si e com a parental. As melhorias nas características podem ser suficientemente profundas tal que a inclusão de um único substituinte pode ser tudo que é necessário para alcançar um critério terapêutico particular.

Alternativamente, a informação compilada a partir do conjunto de variantes únicas pode ser utilizada para desenhar conjuntos adicionais de variantes em que mais de um substituinte é introduzido simultaneamente. Numa estratégia de desenho, todas as variantes de substituinte único são classificadas, as 4 melhores são escolhidas e todas as possíveis combinações duplas (6), triplas (4) e quádruplas (1) destas 4 variantes de substituinte único são sintetizadas e ensaiadas. Numa segunda estratégia de desenho, a melhor variante de substituinte único é considerada como sendo a nova parental e todas as possíveis variantes de substituinte duplo que incluem esta variante de substituinte único de maior classificação são sintetizadas e ensaiadas. Podem ser utilizadas outras estratégias e estas estratégias podem ser aplicadas repetidamente de tal forma que o número de substituintes é gradualmente aumentado enquanto continuando a identificar variantes adicionalmente melhoradas.

A Química Medicinal de Aptâmero pode ser utilizada particularmente como um método para explorar a introdução local, em vez de global, de substituintes. Devido aos aptâmeros serem descobertos dentro de bibliotecas que são

geradas através de transcrição, quaisquer substituintes que são introduzidos durante o processo SELEX™ devem ser introduzidos globalmente. Por exemplo, se é desejado introduzir ligações de fosforotioato entre nucleótidos, então estes somente podem ser introduzidos em cada A (ou cada G, C, T, U etc.) (globalmente substituído). Os aptâmeros que requerem fosforotioatos nalguns As (ou alguns G, C, T, U etc.) (localmente substituídos) mas não o toleram noutros As não podem ser prontamente descobertos através deste processo.

Os tipos de substituinte que podem ser utilizados por parte do processo da Química Medicinal de Aptâmero encontram-se somente limitados pela capacidade de gerá-los como reagentes de síntese de fase sólida e introduzi-los num esquema de síntese de oligómero. O processo certamente não é limitado a nucleótidos por si sós. Esquemas de Química Medicinal de Aptâmero podem incluir substituintes que introduzem volume estérico, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, lipofiliabilidade, lipofobicidade, carga positiva, carga negativa, carga neutra, zwitteriões, polarizabilidade, resistência à nuclease, rigidez conformacional, flexibilidade conformacional, características de ligação a proteínas, massa etc. Esquemas de Química Medicinal de Aptâmero podem incluir modificações de base, modificações de açúcar ou modificações de ligação de fosfodiéster.

Ao considerar os tipos de substituintes que são prováveis de ser benéficos no contexto de um aptâmero terapêutico, pode ser desejável introduzir substituições que caem numa ou mais das seguintes categorias:

- (1) Substituintes já presentes no corpo, por exemplo, purinas ou pirimidinas 2'-desoxi, 2'-ribo, 2'-O-metilo ou citosina 5 -metilo.
- (2) Substituintes já parte de um terapêutico aprovado, por exemplo, oligonucleótidos ligados a fosforotioato.

(3) Substituintes que hidrolisam ou degradam a uma das duas categorias anteriores, por exemplo, oligonucleótidos ligados a metilfosfonato.

Os aptâmeros da presente invenção incluem aptâmeros desenvolvidos por meio de química medicinal de aptâmero descrita no presente documento.

A afinidade de ligação ao alvo dos aptâmeros da presente invenção pode ser avaliada por meio de uma série de reações de ligação entre o aptâmero e o alvo (por exemplo, uma proteína) em que um aptâmero marcado com ^{32}P vestigial é incubado com uma diluição em série do alvo num meio tamponado e então analisado através de filtração em nitrocelulose utilizando um dispositivo de distribuição de filtração a vácuo. Referido no presente documento como o ensaio de ligação *dot blot*, este método utiliza um meio de filtração de três camadas consistindo (do topo para a base) em nitrocelulose, filtro de *nylon* e papel de gel *blot*. O ARN que é ligado ao alvo é capturado no filtro de nitrocelulose enquanto o ARN não ligado ao alvo é capturado no filtro de *nylon*. O papel de gel *blot* é incluído como um meio de suporte para os outros filtros. Após filtração, as camadas do filtro são separadas, secas e expostas numa ecrã de fósforo e quantificadas utilizando um sistema de imagiologia com fósforo a partir das mesmas. Os resultados quantificados podem ser utilizados para gerar curvas de ligação ao aptâmero a partir das quais as constantes de dissociação (K_D) podem ser calculadas. Numa forma de realização preferida, o meio tamponado utilizado para realizar as reações de ligação é 1X PBS de Dulbecco (com Ca^{++} e Mg^{++}) mais 0,1 mg/ml de BSA.

Em geral, a capacidade de um aptâmero de modular a atividade funcional de um alvo, isto é, a atividade funcional do aptâmero, pode ser estimada utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, que variarão dependendo da função biológica do alvo. Nalgumas formas de realização, os

aptâmeros da presente invenção podem inibir uma função biológica conhecida do alvo, enquanto noutras formas de realização os aptâmeros da invenção podem estimular uma função biológica conhecida do alvo. A atividade funcional de aptâmeros da presente invenção pode ser avaliada utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* desenhados para medir uma função conhecida de um componente do complemento alvo.

Os aptâmeros da presente invenção podem ser rotineiramente adaptados para propósitos de diagnóstico de acordo com qualquer uma das numerosas técnicas utilizadas por parte dos peritos na especialidade. A utilização diagnóstica pode incluir tanto aplicações de diagnóstico *in vivo* como *in vitro*. Agentes de diagnóstico somente precisam de ser capazes de permitir que o utilizador identifique a presença de um dado alvo num local ou concentração particular. Simplesmente a capacidade de formar pares de ligação com o alvo pode ser suficiente para disparar um sinal positivo para propósitos de diagnóstico. Os peritos na especialidade também são capazes de adaptar qualquer aptâmero através de procedimentos conhecidos na técnica para incorporar uma etiqueta de marcação, de maneira a rastrear a presença de tal ligando. Uma etiqueta como esta pode ser utilizada em numerosos procedimentos de diagnóstico.

MODULAÇÃO DE FARMACOCINÉTICA E BIODISTRIBUIÇÃO DE AGENTES TERAPÊUTICOS DE APTÂMERO

É importante que as propriedades farmacocinéticas para todos os agentes terapêuticos a base de oligonucleótido, incluindo aptâmeros, sejam adaptadas para corresponder à aplicação farmacêutica desejada. Enquanto aptâmeros direcionados contra alvos extracelulares não sofrem dificuldades associadas com distribuição intracelular (como é o caso com terapêuticos à base de anti-sentido e ARNi), tais aptâmeros devem ainda ser capazes de ser administrados aos órgãos e tecidos alvo e permanecer no corpo (não

modificados) durante um período de tempo consistente com o regime de dosagem desejado.

Conseqüentemente, a presente invenção proporciona materiais e métodos para afetar a farmacocinética da composição de aptâmeros e, em particular, a capacidade de regular a farmacocinética do aptâmero. A capacidade de regulação (isto é, a capacidade de modular) da farmacocinética do aptâmero é alcançada por meio da conjugação das frações de modificação (por exemplo, polímeros PEG) ao aptâmero e/ou a incorporação de nucleótidos modificados (por exemplo, 2'-fluoro ou 2'-O-metilo) para alterar a composição química do ácido nucleico. A capacidade de modular a farmacocinética do aptâmero é utilizada na melhoria das aplicações terapêuticas existentes, ou alternativamente, no desenvolvimento de novas aplicações terapêuticas. Por exemplo, nalgumas aplicações terapêuticas, por exemplo, em ambientes de cuidados antineoplásicos ou agudos onde pode ser desejada depuração ou extinção rápida do medicamento, é desejável diminuir os tempos de permanência de aptâmeros na circulação. Alternativamente, noutras aplicações terapêuticas, por exemplo, terapias de manutenção onde é desejada circulação sistêmica de um terapêutico, pode ser desejável aumentar os tempos de permanência de aptâmeros na circulação.

Além disso, a capacidade de regulação da farmacocinética do aptâmero é utilizada para modificar a biodistribuição de um aptâmero terapêutico num indivíduo. Por exemplo, nalgumas aplicações terapêuticas, pode ser desejável alterar a biodistribuição de um aptâmero terapêutico numa tentativa de visar um tipo particular de tecido ou um órgão (ou conjunto de órgãos) específico. Nestas aplicações, o aptâmero terapêutico acumula-se preferentemente num tecido ou órgão(s) específico(s). Noutras aplicações terapêuticas, pode ser desejável visar

tecidos exibindo um marcador celular ou um sintoma associado com uma dada doença, lesão celular ou outra patologia anormal, de tal forma que o aptâmero terapêutico se acumula preferentemente no tecido afetado. Por exemplo, tal como descrito no Pedido de Patente Provisório US N° de Série 60/550790 (documento US 2006/0030535), depositado a 5 de Março de 2004, e intitulado "Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics", e no Pedido de Patente Não Provisório US N° de Série 11/075.648 (documento US 2006/0030535), depositado a 7 de Março de 2005, e intitulado "Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics", é utilizada PEGuilação de um aptâmero terapêutico (por exemplo, PEGuilação com um polímero PEG 20 kDa) para visar tecidos inflamados, de tal forma que o aptâmero terapêutico PEGuilado se acumula preferentemente no tecido inflamado.

Para determinar os perfis farmacocinético e de biodistribuição de agentes terapêuticos de aptâmero (por exemplo, conjugados de aptâmeros ou aptâmeros tendo químicas alteradas, tais como nucleótidos modificados) uma variedade de parâmetros são monitorizados. Tais parâmetros incluem, por exemplo, a semivida ($t_{1/2}$), a depuração em plasma (Cl), o volume de distribuição (Vss), a área sob a curva (AUC) concentração-tempo, concentração em soro ou em plasma máxima observada (C_{max}), e o tempo de permanência médio (MRT) de uma composição de aptâmero. Conforme utilizado no presente documento, o termo "AUC" refere-se à área sob o gráfico da concentração em plasma de um aptâmero terapêutico frente ao tempo após administração do aptâmero. O valor de AUC é utilizado para estimar a biodisponibilidade (isto é, a percentagem de aptâmero terapêutico administrada na circulação após administração do aptâmero) e/ou depuração total (Cl) (isto é, a taxa à qual o aptâmero terapêutico é removido a partir da

circulação) de um dado aptâmero terapêutico. O volume de distribuição refere-se à concentração em plasma de um agente terapêutico de aptâmero para a quantidade de aptâmero presente no corpo. Quanto maior V_{ss} , mais um aptâmero é encontrado fora do plasma (isto é, mais extravasão).

A presente invenção proporciona materiais e métodos para modular, de maneira controlada, a farmacocinética e biodistribuição de composições de aptâmero estabilizadas *in vivo* conjugando um aptâmero com uma fração de modulação tal como uma molécula pequena, péptido, ou grupo terminal de polímero, ou incorporando nucleótidos modificados num aptâmero. Conforme descrito no presente documento, a conjugação de uma fração de modificação e/ou a alteração de uma composição química de nucleótido(s) altera aspetos fundamentais do tempo de permanência do aptâmero na circulação e distribuição aos tecidos.

Além da depuração através de nucleases, os agentes terapêuticos de oligonucleótidos são submetidos a eliminação por meio de filtração renal. Como tal, um oligonucleótido resistente à nuclease administrado por via intravenosa exhibe tipicamente uma semivida *in vivo* < 10 a menos que a filtração possa ser bloqueada. Isto pode ser realizado ou facilitando a distribuição rápida fora da corrente sanguínea para os tecidos ou aumentando a massa molecular aparente do oligonucleótido por cima do tamanho eficaz cortado para o glomérulo. A conjugação de agentes terapêuticos pequenos com um polímero PEG (PEGuilação), descrita abaixo, pode prolongar dramaticamente os tempos de permanência dos aptâmeros na circulação, diminuindo conseqüentemente a frequência de dosagem e potenciando a eficácia contra alvos vasculares.

Adicionalmente, a filtração de aptâmero a partir do tecido ocular também pode ser modulada, particularmente bloqueada, aumentando a massa molecular aparente do

aptâmero da invenção, tal como através de conjugação a um polímero PEG.

Os aptâmeros podem ser conjugados a uma variedade de frações de modificação, tal como polímeros de alto massa molecular, por exemplo, PEG; péptidos, por exemplo, Tat (um fragmento de 13 aminoácidos da proteína Tat de VIH (Vives, *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.* 272(25): 16010-7)), Ant (uma sequência de 16 aminoácidos derivada a partir da terceira hélice da proteína homeótica *antennapedia* de *Drosophila* (Pietersz, *et al.* (2001), *Vaccine* 19(11-12): 1397-405)) e Arg₇ (um péptido curto, com carga positiva que permeia na célula composto de poliarginina (Arg₇) (Rothbard, *et al.* (2000), *Nat. Med.* 6(11): 1253-7; Rothbard, J *et al.* (2002), *J. Med. Chem.* 45(17): 3612-8)); e moléculas pequenas, por exemplo, compostos lipofílicos, tal como o colesterol. Entre os vários conjugados descritos no presente documento, as propriedades *in vivo* dos aptâmeros são alteradas mais profundamente através de conjugação com grupos PEG. Por exemplo, descrita no pedido de patente não provisório referenciado anteriormente (US N° de série 11/075.648 depositado a 7 de Março de 2005, e intitulado "Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics"), a conjugação de um aptâmero terapêutico com um polímero PEG de 20 kDa impede a filtração renal e promove a distribuição do aptâmero a tecidos tanto saudáveis como inflamados. Além disso, o conjugado de polímero PEG de 20 kDa-aptâmero mostra-se tão eficaz como um polímero PEG de 40 kDa na prevenção da filtração renal de aptâmeros. Enquanto um efeito da PEGuilação ocorre durante a depuração do aptâmero, a exposição sistémica prolongada disponibilizada através da presença da fração de 20 kDa também facilita a distribuição do aptâmero aos tecidos, particularmente os dos órgãos altamente perfundidos e os no local da inflamação. O conjugado de aptâmero-polímero PEG de 20 kDa dirige a

distribuição do aptâmero ao local da inflamação, de tal forma que o aptâmero PEGuilado se acumula preferentemente no tecido inflamado. Nalguns exemplos, o conjugado aptâmero PEGuilado de 20 kDa é capaz de ter acesso ao interior de células, tais como, por exemplo, células renais.

Em geral, os efeitos sobre a farmacocinética do aptâmero e a distribuição do tecido produzidos por parte de frações de modificação de baixa massa molecular, incluindo colesterol e péptidos de permeação celular são tipicamente menos pronunciados que os produzidos como um resultado de PEGuilado ou modificação de nucleótidos (por exemplo, uma composição química alterada). Embora não pretendendo ser limitado pela teoria, é sugerido que associações mediadas por colesterol com lipoproteínas em plasma, postuladas para ocorrer no caso do conjugado anti-sentido, são excluídas no contexto particular da estrutura dobrada do conjugado de aptâmero-colesterol e/ou referem-se ao aspeto da natureza lipofílica do grupo colesterol. Como o colesterol, a presença de uma etiqueta de péptido Tat promove a depuração de aptâmero a partir da corrente sanguínea, com níveis comparativamente altos de conjugado aparecendo nos rins às 48 horas. Outros péptidos (por exemplo, Ant, Arg₇) que foram relatados na técnica para mediar a passagem de macromoléculas através das membranas celulares *in vitro*, não parecem promover a depuração de aptâmero a partir da circulação. Contudo, como Tat, o conjugado Ant acumula-se significativamente nos rins em relação a outros aptâmeros. Embora não pretendendo ficar limitado pela teoria, é possível que a apresentação desfavorável de frações de modificação dos péptidos Ant e Arg₇ no contexto de aptâmeros dobrados tridimensionalmente *in vivo* prejudique a capacidade destes péptidos de influenciar as propriedades de transporte de aptâmero.

Também podem ser utilizados nucleótidos modificados para modular a depuração em plasma de aptâmeros. Por

exemplo, um aptâmero não conjugado que incorpora por exemplo, químicas de estabilização de 2'-fluoro, 2'-OMe, e/ou fosforotioato, que é típico de aptâmeros de geração atual uma vez que exibe um alto grau de estabilidade por parte de nucleases *in vitro* e *in vivo*, apresenta perda rápida a partir de plasma (por exemplo, depuração rápida a partir do plasma) e uma rápida distribuição nos tecidos, principalmente nos rins, em comparação a aptâmero não modificado.

Ácidos Nucleicos Derivatizados através de PAG

Conforme descrito anteriormente, a derivatização de ácidos nucleicos com polímeros não imunogênicos de elevada massa molecular tem o potencial para alterar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de ácidos nucleicos tornando-os em agentes terapêuticos mais eficazes. Alterações favoráveis na atividade podem incluir maior resistência à degradação por parte de nucleases, filtração diminuída através dos rins, exposição diminuída ao sistema imune e distribuição alterada do agente terapêutico ao longo do corpo.

As composições de aptâmero da invenção podem ser derivatizadas com frações de polialquilenoglicol ("PAG"). Exemplos de ácidos nucleicos derivatizados por PAG são encontrados no pedido de patente US N° de Série 101/718.833 (documento US 2004/0180360), depositado a 21 de Novembro de 2003. Polímeros típicos utilizados na invenção incluem polietilenoglicol ("PEG"), também conhecido como poli(óxido de etileno) ("PEO") e polipropilenoglicol (incluindo poliisopropilenoglicol). Adicionalmente, copolímeros aleatórios ou em bloco ou diferentes óxidos de alquilenos (por exemplo, óxido de etileno e óxido de propileno) podem ser utilizados em muitas aplicações. Na sua forma mais comum, um polialquilenoglicol, tal como PEG, é um polímero linear terminado em cada terminal com grupos hidroxilo: HO-CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂-OH. Este polímero, alfa-, omega-

diidroxilpoli(etilenoglicol), também pode ser representado como HO-PEG-OH, onde é entendido que o símbolo - PEG- representa a seguinte unidade estrutural: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ onde n tipicamente varia desde cerca de 4 até cerca de 10.000.

Os polímeros PAG adequados para indicações terapêuticas tipicamente têm as propriedades de solubilidade em água e em muitos solventes orgânicos, falta de toxicidade, e falta de imunogenicidade. Um utilização de PAGs é ligar covalentemente o polímero a moléculas insolúveis para tornar o "conjugado" PAG-molécula resultante solúvel. Por exemplo, foi mostrado que o fármaco insolúvel em água paclitaxel, quando acoplado a PEG, se torna solúvel em água. Greenwald, et al., J. Org. Chem., 60:331-336 (1995). Os conjugados de PAG são frequentemente utilizados não só para melhorar a solubilidade e estabilidade, mas também para prolongar a semivida na circulação sanguínea das moléculas.

A capacidade de derivatização de PAG, por exemplo, conjugação de PEG, de alterar a biodistribuição de um terapêutico está relacionada com numerosos fatores incluindo o tamanho aparente (por exemplo, conforme medido em termos de raio hidrodinâmico) do conjugado. É sabido que conjugados maiores (>10 kDa) bloqueiam mais eficazmente a filtração através dos rins e conseqüentemente aumentam a semivida em soro de macromoléculas pequenas (por exemplo, péptidos, oligonucleótidos anti-sentido). A capacidade de conjugados PEG de bloquear a filtração foi mostrada como aumentando com o tamanho do PEG até aproximadamente 50 kDa (aumentos adicionais têm efeito benéfico mínimo uma vez que a semivida se toma definida por parte do metabolismo mediado por macrófagos em vez de eliminação através dos rins).

Os compostos derivatizados de PAG da invenção têm tipicamente entre 5 e 80 kDa de tamanho, no entanto

qualquer tamanho pode ser utilizado, a escolha dependendo do aptâmero e aplicação. Outros compostos derivatizados de PAG da invenção têm entre 10 e 80 kDa de tamanho. Ainda outros compostos derivatizados de PAG da invenção têm entre 10 e 60 kDa de tamanho. Nalgumas formas de realização, as frações de PAG derivatizadas a composições da presente invenção são PEG variando a partir de 10, 20, 30, 40, 50, 60, ou 80 kDa de tamanho. Nalgumas formas de realização, o PEG é PEG linear, enquanto noutras formas de realização, o PEG é PEG ramificado. Ainda noutras formas de realização o PEG é um PEG de 40kDa ramificado conforme ilustrado na Figura 4. Nalgumas formas de realização o PEG ramificado de 40 kDa é ligado à extremidade 5' do aptâmero conforme ilustrado na Figura 5.

A presente invenção proporciona uma via económica à síntese de conjugados PEG-ácido nucleico (preferentemente, aptâmero) de elevada massa molecular incluindo ácidos nucleicos multiplamente PEGuilados. A presente invenção também abrange oligonucleótidos multiméricos ligados a PEG, por exemplo, aptâmeros dimerizados. Em contraste aos agentes terapêuticos de proteína expressa biologicamente, os agentes terapêuticos de ácido nucleico são tipicamente quimicamente sintetizados a partir de nucleótidos de monómero ativado. Os conjugados de PEG-ácido nucleico podem ser preparados por meio da incorporação de PEG utilizando a mesma síntese iterativa de monómero. Por exemplo, PEGs ativados através da conversão a uma forma de fosforamidite podem ser incorporados na síntese de oligonucleótido em fase sólida. Alternativamente, a síntese de oligonucleótidos pode ser completada com incorporação específica de sítio de um sítio de ligação a PEG reativo.

PEG ATIVADO

A produção de PEGs de elevada massa molecular (>10 kDa) pode ser difícil, ineficaz, e cara. Como uma via em direção à síntese de conjugados de PEG -ácido nucleico de

elevada massa molecular, trabalhos anteriores tiveram como foco a geração de PEGs ativados de massa molecular mais elevada. O método para gerar tais moléculas envolve a formação de um PEG ativado linear, ou um PEG ativado ramificado em cujo caso dois ou mais PEGs são ligados a um núcleo central portando o grupo ativado. As porções terminais destas moléculas de PEG de massa molecular mais elevada, isto é, as frações de hidroxilo (-OH) relativamente não reativas, podem ser ativadas, ou convertidas a frações funcionais, para ligação de um ou mais dos PEGs a outros compostos nos sítios reativos do composto. PEGs ativados ramificados terão mais de dois terminais, e em casos onde dois ou mais terminais forem ativados, tais moléculas de PEG ativado de massa molecular mais elevada são denominadas no presente documento, PEGs multi-ativados. Nalguns casos, nem todos os terminais numa molécula de PEG ramificado são ativados. Em casos onde quaisquer dois terminais de uma molécula de PEG ramificado são ativados, tais moléculas de PEG são denominadas PEGs bi-ativados. Nalguns casos onde somente um terminal numa molécula de PEG ramificado é ativado, tais moléculas de PEG são denominadas mono-ativadas. Como um exemplo desta abordagem, foi descrito PEG ativado preparado através da ligação de dois PEGs monometoxi a um núcleo de lisina que é subsequentemente ativado para reação (Harris et al., Nature, vol.2: 214-221, 2003).

Conforme mostrado na Figura 6, a molécula de PEG linear é difuncional e é algumas vezes referida como "PEG diol". As porções terminais da molécula de PEG são frações hidroxilo relativamente não reativas, os grupos -OH, que podem ser ativados ou convertidos a frações funcionais, para ligação do PEG a outros compostos em sítios reativos do composto. Tais PEG dióis ativados são referidos no presente documento como PEGs bi-ativados. Por exemplo, as frações terminais de PEG diol foram funcionalizadas como

éster de carbonato ativo para reação seletiva com frações amino através da substituição das frações hidroxilo relativamente não reativas, -OH, com frações de éster de succinimidilo ativas a partir de N-hidroxi succinimida. Alternativamente, os PEG dióis podem ser ativados com uma variedade de grupos incluindo sem limitação ácidos α -halo acéticos, epihalohidrinas, maleatos, tartaratos e hidratos de carbono que após manipulação adequada renderiam um carbonilo ativado ou equivalente para conjugação. Outros métodos de ativar PEG são descritos em Roberts *et al.*, (2002) *Advanced Drug Deliver Reviews* 54:549-476. Além de ativar PEG utilizando um dos métodos previamente descritos, uma ou ambas das funcionalidades álcool terminal da molécula de PEG pode ser modificada para permitir diferentes tipos de conjugação a um ácido nucleico. Por exemplo, a conversão das funcionalidades de álcool terminal a uma amina, ou um tiol, permite o acesso a conjugados de ureia e tiouretano.

Em muitas aplicações é desejável limitar a molécula de PEG num terminal com uma fração essencialmente não reativa, de tal forma que a molécula de PEG seja mono-funcional (ou mono-ativada). No caso de agentes terapêuticos de proteínas que geralmente apresentam múltiplos sítios de reação para PEGs ativados, PEGs ativados bi-funcionais levam a reticulação extensiva, rendendo agregados fracamente funcionais. Para gerar PEGs monoativados, uma fração hidroxilo no terminal da molécula de PEG diol é tipicamente substituída por uma fração de extremidade metoxi não reativa, -OCH₃. O outro terminal não limitado da molécula de PEG é tipicamente convertido a uma fração de extremidade reativa que pode ser ativada para anexação a um sítio reativo numa superfície ou uma molécula, tal como uma proteína.

APTÂMEROS CONJUGADOS A UM OU MAIS PEGS

Mais comumente, a síntese de conjugados PAG-ácido

nucleico de elevada massa molecular foi realizada através da adição de uma amina primária livre no terminal 5' (incorporada utilizando uma fosforamidite de modificação na última etapa de acoplamento da síntese de fase sólida). Utilizando esta abordagem, um PEG reativo (por exemplo, um que é ativado de forma a reagir e formar uma ligação com uma amina) é combinado com o oligonucleótido purificado e a reação de acoplamento é realizada em solução.

Além disso, os conjugados de PAG -ácido nucleico-PAG de elevada massa molecular podem ser preparados através da reação de um PEG ativado mono-funcional com um ácido nucleico contendo mais do que um sítio reativo. Numa forma de realização, o ácido nucleico é bi-reativo e contém dois sítios reativos: um grupo 5'-amino e um grupo 3'-amino introduzidos no oligonucleótido por meio da síntese de fosforamidite convencional e iniciando com um suporte sólido de 3'-amina; por exemplo: 3'-5'-di-PEGuilação, conforme ilustrado na Figura 6. Em formas de realização alternativas, podem ser introduzidos sítios reativos em posições internas utilizando, por exemplo, a posição 5 de pirimidinas, a posição 8 de purinas, ou a posição 2' de ribose como sítios para ligação de aminas primárias. Em tais formas de realização, o ácido nucleico pode ter vários sítios ativados ou reativos e é dito ser multiplamente ativado.

Para produzir um conjugado ácido nucleico-PEG-ácido nucleico, o ácido nucleico é originalmente sintetizado, de tal forma a suportar um único sítio reativo (por exemplo, é mono-ativado). Numa forma de realização preferida, este sítio reativo é um conjunto amino introduzido no terminal 5' através da adição de uma fosforamidite modificadora como a última etapa na síntese de fase sólida do oligonucleótido. Noutra forma de realização preferida, a síntese é realizada utilizando um modificador de amina 3', mais introduzindo uma amina no terminal 5', levando a um

oligonucleótido-di-amina 3', 5'. Após desproteção e purificação dos oligonucleótidos modificados, este é reconstituído a alta concentração numa solução que minimiza a hidrólise espontânea do PEG ativado. Numa forma de realização preferida, a concentração de oligonucleótido é 1 mM e a solução reconstituída contém 200 mM de tampão NaHCO_3 , pH 8,3. A síntese do conjugado é iniciada através de adição lenta, em etapas de PEG ativado altamente purificado. Numa forma de realização preferida, o PEG é ativado como carbonato de p-nitrofenilo. Após reação, o conjugado PEG-ácido nucleico é purificado através de eletroforese em gel ou cromatografia líquida para separar espécies completa, parcial e não conjugadas.

MÚLTIPLOS APTÂMEROS CONJUGADOS A UM PEG

A presente invenção também abrange composições de aptâmero de elevada massa molecular em que duas ou mais frações de ácido nucleico são covalentemente conjugadas a pelo menos uma fração de polialquilenoglicol. As frações de polialquilenoglicol servem como frações de estabilização. Uma fração de estabilização é uma molécula, ou porção de uma molécula, que melhora as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das composições de aptâmero de elevada massa molecular da invenção. Nalguns casos, uma fração de estabilização é uma molécula ou porção de uma molécula que coloca dois ou mais aptâmeros, ou domínios de aptâmero, em proximidade, ou proporciona liberdade rotacional global diminuída das composições de aptâmero de elevada massa molecular da invenção. Uma fração de estabilização pode ser um polialquilenoglicol, tal como um polietilenoglicol, que pode ser linear ou ramificado, um homopolímero ou um heteropolímero. Outras frações de estabilização incluem polímeros, tais como ácidos nucleicos de péptido (PNA). Os oligonucleótidos também podem ser frações de estabilização; tais oligonucleótidos podem incluir nucleótidos modificados, e/ou ligações modificadas, tais como

fosforotioatos.

Uma fração de estabilização pode ser uma parte integral de uma composição de aptâmero, isto é, encontra-se covalentemente ligada ao aptâmero. Em composições onde uma fração de polialquilenoglicol é covalentemente ligada em qualquer extremidade a um aptâmero, de tal forma que o polialquilenoglicol liga as frações de ácido nucleico numa molécula, o polialquilenoglicol é dito ser uma fração de ligação. Em tais composições, a estrutura primária da molécula covalente inclui o ácido nucleico-PAG-ácido nucleico de disposição linear. Um exemplo de uma composição onde uma fração de estabilização de PEG serve como um ligando que separa diferentes porções de um aptâmero, é uma composição onde PEG é conjugado numa única sequência de aptâmeros, de tal forma que o arranjo linear da composição de aptâmero de elevada massa molecular seja, por exemplo, ácido nucleico - PEG - ácido nucleico (- PEG - ácido nucleico)_n onde n é maior que ou igual a 1.

Para produzir um conjugado de ácido nucleico-PEG-ácido nucleico, o ácido nucleico é originalmente sintetizado de tal forma que porte um único sítio reativo (por exemplo, é monoativado). Numa forma de realização preferida, este sítio reativo é um conjunto amino introduzido no terminal 5' através da adição de uma fosforamidite modificadora na última etapa na síntese de fase sólida do oligonucleótido. Após desproteção e purificação do oligonucleótido modificado, este é reconstituído em alta concentração numa solução que minimiza a hidrólise espontânea do PEG ativado. Numa forma de realização preferida, a concentração de oligonucleótido é 1 mM e a solução reconstituída contém 200 mM de tampão NaHCO₃, pH 8,3. A síntese do conjugado é iniciada através de adição lenta, em etapas de PEG bifuncional altamente purificado. Numa forma de realização preferida, o PEG diol é ativado em ambas extremidades (bi-ativado) através de derivatização como carbonato de p-

nitrofenilo. Após reação, o conjugado PEG-ácido nucleico é purificado através de eletroforese em gel ou cromatografia líquida para separar espécies completa, parcial ou não conjugadas. Múltiplas moléculas de PAG concentradas (por exemplo, na forma de copolímeros aleatórios ou em bloco) ou cadeias de PAG menores podem ser ligadas para alcançar vários comprimentos (ou massas moleculares). Podem ser utilizados ligandos não-PAG entre cadeias PAG de variados comprimentos.

Os domínios de ligação também podem ter uma ou mais frações de polialquileno glicol unidas aos mesmos. Tais PAGs podem ser de comprimentos variados e podem ser utilizados em combinações adequadas para alcançar a massa molecular desejada da composição.

O efeito de um ligando particular pode ser influenciado tanto pela sua composição química como comprimento. Um ligando que é muito grande, muito pequeno ou forma interações estéricas e/ou iônicas desfavoráveis com o componente do complemento alvo impedirá a formação de complexo entre o aptâmero e o componente do complemento alvo. Um ligando, que é maior que o necessário para transpor a distância entre ácidos nucleicos, pode reduzir a estabilidade de ligação diminuindo a concentração eficaz do ligando. Conseqüentemente, é frequentemente necessário otimizar composições e comprimentos de ligando, de maneira a maximizar a afinidade de um aptâmero a um alvo.

Aptâmeros com Afinidade de Ligação à Proteína C5 do Sistema Complemento

Nalgumas formas de realização da presente invenção, são descritos aptâmeros que são capazes de ligar especificamente e modular a proteína C5 do complemento. Estes aptâmeros proporcionam uma baixa toxicidade, segurança, e forma de realização eficaz de tratar, aliviar e/ou prevenir uma variedade de doenças ou distúrbios relacionadas com o complemento incluindo DMRI de tipo

exsudativo. Estes aptâmeros também podem ser utilizados em diagnósticos.

Nalgumas formas de realização, os aptâmeros da presente invenção podem ser utilizados como uma modalidade de baixa toxicidade, segura, e eficaz de tratamento, estabilização e/ou prevenção de DMRI de tipo exsudativo ("húmida").

É proporcionado um aptâmero isolado de ocorrência não natural que liga à proteína do complemento C5. É proporcionado um aptâmero isolado, de ocorrência não natural que liga à proteína do complemento C5 para utilização nos métodos da invenção para tratar, estabilizar e/ou prevenir um distúrbio DMRI de tipo exsudativo. O aptâmero isolado, de ocorrência não natural tem uma constante de dissociação (" K_d ") para proteína do complemento C5 menor do que 100 μM , menor do que 1 μM , menor do que 500 nM, menor do que 100 nM, menor do que 50 nM, menor do que 1 nM, menor do que 500 pM, menor do que 100 pM, menor do que 50 pM. A constante de dissociação pode ser determinada através de titulação *dot blot*, conforme descrito no Exemplo 1 a seguir.

O aptâmero para utilização nos métodos da invenção modula uma função da proteína do complemento C5, particularmente inibe uma função da proteína do complemento C5 e/ou função variante da proteína do complemento C5. Uma variante da proteína do complemento C5, conforme utilizado no presente documento, abrange variantes que realizam essencialmente a mesma função que uma função da proteína do complemento C5. Uma variante da proteína do complemento C5 compreende preferentemente substancialmente a mesma estrutura e Nalgumas formas de realização compreende pelo menos 80 % de identidade de sequência, mais preferentemente pelo menos 90 % de identidade de sequência, e mais preferentemente pelo menos 95 % de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos da proteína do complemento

C5 compreendendo a sequência de aminoácidos abaixo (SEQ ID NO: 102) (citada em Haviland *et al.*, J Immunol. 1 de Janeiro de 1991; 146(1):362-8):

```

1  mgllgilcfl iflgktwgqe qtyvisapki frvgaseniv iqvygyteaf datisiksyp
61  dkkfsysssh vhlssenkfq nsailtiqpk qlpggqnpvs yvylevvskh fskskrmpit
121 ydngflfiht dkpvytpdqs vkvrvylnlnd dlkpakretv ltfidpegse vdmveeidhi
181 giisfpdfki psnprygmwt ikakykedfs ttgtayfevk eyvlphfsvs iepaynfigy
241 knfknfeiti karyfynkvv teadvyitfg iredlkddqk emmqtamqnt mlingiaqvt
301 fdsetavkel syysledlnn kylyiavtvi estggfseea eipgikyvls pyklnlvatp
361 lflkpgpipyp ikvqvksld qlvggvptvl naqtidvnqe tsdlpdksv trvddgvasf
421 vlnlpsgvtv lefnvktvap dlpeenqare gyraiayssl sqsylyidwt dnhkallvge
481 hlniivtpks pyidkithyn ylilskgkii hfgtrekfsd asyqsinipt tqnmvpsrsl
541 lvyvvtgeq taelvsdsvw lniececgnq lqvhlspdad ayspgqtvsl nmatgmdswv
601 alaavdsavy gvqrgakkpl ervfqfleks dlqcgagggl nnavfhlag ltflltnanad
661 dsqendepck eilrprrtlq kkieeiaaky khsvvkkccy dgacvndet ceqraarisl
721 gprcikaftc ccvvasqlra nishkdmqlg rlmhktllpv skpeirsyfp eswlwevhlv
781 prrkqlqfal pdslltweiq gvgisntgic vadtvkakvf kdvflemnlp ysvvrgeqiq
841 lkgtvynyrt sgmqfvcvms avegictses pvidhggtsk skcvrqqveg ssshlvtftv
901 lpleiglhni nfsletwfgk eilvktlrsv pegvkresys gvtldprgiy gtisrrkefp
961 yripdlvlpk teikrilsvk gllvgeilsa vlsqeginil thlpkgsaea elmsvvpvfy
1021 vfhyletgnh wnfhsdppli ekqklkkklk egmlsimsyr nadysysvkw ggsastwlta
1081 falrvlgqvn kyveqnsi cnsllwlvn yqldngsfke nsqyqpiqlq gtlpvearen
1141 slyltaftvi girkafdicp lvkidtalik adnflentl paqstftlai sayalslgdk
1201 thpqfrsivs alkrealvkg nppiyrfwkd nlqhkdsstp ntgtarmvet tayalltsln
1261 lkdiyvnvkv ikwlseeqry gggfystqdt inaiegltey sllvkqlrls mdidvsykhk
1321 galhnykmtv knflgrpvev llnddlivst gfgsglatvh vttvvhktst seevcsfylk
1381 idtqdieash yrqygnsdyk rivacasykp sreesssgss havmdislp gisaneedlk
1441 alvegvdqlf tdyqikdghv ilqlnsips dflcvrfrif elfevgflsp atftvyeyhr
1501 pdkqctmfys tsnikiqkvc egaackvea dcgqmgeeld ltisaetrkq tackpeiaya
1561 ykvsitsitv envfvkykat lldiyktgea vaekdseitf ikkvtctnae lvkgrqylim
1621 gkealqikyn fsfryiypld sltwiewwpr dtccsscqaf lanldefaed iflnge

```

Nalgumas formas de realização da invenção, a identidade de sequência de variantes alvo é determinada utilizando BLAST conforme descrito abaixo. Os termos "identidade de sequência" no contexto de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos ou proteínas, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que são as mesmas ou têm uma percentagem especificada de resíduos de aminoácidos ou nucleótidos que são os mesmos, quando comparados e alinhados para a correspondência máxima, conforme medido utilizando um dos seguintes algoritmos de comparação de sequência ou através de inspeção visual. Para a comparação de sequência, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência com a qual sequências de teste são comparadas. Usando um algoritmo de comparação de

sequência, sequências de teste e de referência são introduzidas num computador, coordenadas subsequentes são designadas se necessário, e parâmetros do programa de algoritmo de sequência são designados. O algoritmo de comparação de sequência calcula então a percentagem de identidade de sequência para a(s) sequência(s) de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa designados. O alinhamento ideal de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, através do algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), através do algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, *J Mol. Biol.* 48: 443 (1970), através do método de pesquisa de semelhança de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), através de implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), ou através de inspeção visual (em geral veja-se, Ausubel *et al.*, *infra*).

Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a percentagem de identidade de sequência é o algoritmo utilizado na ferramenta de pesquisa de alinhamento de local básica (doravante no presente documento "BLAST"), veja-se, por exemplo, Altschul *et al.*, *J Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990) e Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 15: 3389-3402 (1997). O *software* para realizar análises BLAST encontra-se publicamente disponível através do National Center for Biotechnology Information (doravante no presente documento "NCBI"). Os parâmetros padrão utilizados na determinação da identidade de sequência utilizando o *software* disponível do NCBI, por exemplo, BLASTN (para sequências de nucleótidos) e BLASTP (para sequências de aminoácidos) são descritos em McGinnis *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 32: W20-W25 (2004).

Os aptâmeros anti-C5 da invenção incluem uma mistura

de nucleótidos modificados 2'-fluoro, nucleótidos modificados 2'-OMe ("2'-OMe") e resíduos de purina 2'-OH. Uma sequência genérica descritiva (SEQ ID NO: 1) para um aptâmero anti-C5 modificado é mostrada abaixo no Quadro 1, e a estrutura é mostrada na Figura 3A. A vasta maioria de purinas (A e G) foi modificada a 2'-OMe, excluindo somente dois resíduos G que permanecem 2'-OH (resíduos mostrados delineados). Os resíduos circulados representam um subconjunto de pirimidinas que podem ser simultaneamente modificadas a 2'-H sem alterar substancialmente a atividade anti-C5 do aptâmero (veja-se ARC330 no Quadro 1 abaixo (SEQ ID NO: 2, Figura 3B)). Os resíduos sublinhados mostrados na Figura 3A representam resíduos de pirimidina que podem conter ou uma modificação 2'-flúor quanto 2'-H (mas não 2'-OMe), enquanto os resíduos em quadrados representam resíduos de pirimidina que podem conter tanto uma modificação 2'-fluoro quanto 2-OMe (mas não 2'-H). Os resíduos indicados com uma seta (→) devem conter uma modificação 2'-fluoro. Sem uma modificação 2'-fluoro nos resíduos indicados por uma seta (→), a atividade hemolítica resultante do aptâmero resultante é substancialmente menor.

Um exemplo de um aptâmero anti-C5 é ARC186 (SEQ ID NO: 4) que é mostrado na Figura 3C e descrito na Patente US N° de Série 6.395.888. Todos os 21 resíduos de pirimidina de ARC186 têm modificações 2'-fluoro. A maioria das purinas (14 resíduos) tem modificações 2'-OMe, exceto para três resíduos de purina 2'-OH (mostrados em sublinhado na Figura 3C). Os aptâmeros anti-C5 também podem incluir diferentes misturas de modificações 2'-fluoro e 2-H. Por exemplo, outro aptâmero anti-C5 da invenção é o ARC334 (SEQ ID NO: 2) mostrado na Figura 3B. ARC330 (SEQ ID NO: 2) contém sete modificações 2'-H (resíduos circulados na Figura 3B), 14 resíduos de pirimidina com modificações 2'-fluoro, 14 resíduos de purina com modificações 2'-OMe, e três resíduos de purina 2'-OH (mostrados em sublinhado na Figura 3B).

Outras combinações de aptâmeros contendo uma mistura de modificações 2'-fluoro, modificações 2-OMe, resíduos de purina 2'-OH e conjugação a compostos não imunogênicos de elevada massa molecular (por exemplo, PEG) de vários tamanhos, cada um dos quais foram derivados de ARC186 (SEQ ID NO: 4), são descritos no Quadro I a seguir. A divulgação também compreende aptâmeros conforme descrito a seguir, mas carecendo da capa 3' indicada (por exemplo, *cap* de desoxitimidina invertida) e/ou aptâmeros indicados a seguir, mas compreendendo uma capa 3' (por exemplo, dT invertido) onde um *cap* 3' não é indicada.

A menos que de outra forma indicado, as sequências de nucleótidos no Quadro 1 a seguir são listadas na direção 5' para 3'. Para cada uma das sequências individuais do Quadro 1, todas as modificações 2-OMe de purina ou pirimidina são indicadas por um "m" antes do nucleótido correspondente; todas as modificações 2'-fluoro de pirimidina são indicadas por um "f " antes do nucleótido correspondente; todas as modificações desoxi de purina ou pirimidina são indicadas por um "d" antes do nucleótido correspondente; e qualquer purina e pirimidina aparecendo sem um "m", "f, ou "d" antes do nucleótido indica um resíduo 2-OH. Adicionalmente um "3T" indica uma desoxitimidina invertida, "NH" indica um ligando hexilamina, "NH₂" indica um grupo terminal hexilamina, "PEG" indica um grupo polietileno glicol com a massa molecular indicado, e "biotina" indica um aptâmero tendo biotina conjugada à extremidade 5'.

Quadro 1:

SEQ ID NO: 1

X₁X₂fCfCrGfCX₃X₄fUX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁rGX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃fUfUX₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉

onde:

X₁=fC ou mC

X₂=rG ou gy

X₃=rG ou mG

- X₄=rG ou mG
- X₅=fC ou dC
- X₆=fU ou dT
- X₇=fC ou dC
- X₈=rA ou mA
- X₉=rG ou mG
- X₁₀=rG ou mG
- X₁₁=fC ou dC
- X₁₂=fC ou mC
- X₁₃=fU ou mU
- X₁₄=rG ou mG
- X₁₅=rA ou mA
- X₁₆=rG ou mG
- X₁₇=fU ou dT
- X₁₈=fC ou dC
- X₁₉=fU ou dT
- X₂₀=rG ou mG
- X₂₁=rA ou mA
- X₂₂=rG ou mG
- X₂₃=fU ou dT
- X₂₄=rA ou mA
- X₂₅=fC ou dC
- X₂₆=fC ou dC
- X₂₇=fU ou dT
- X₂₈=rG ou mG
- X₂₉=rG ou mG

ARC330 (SEQ ID NO: 2)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfcmG

ARC185 (SEQ ID NO: 3)

GAfCGAfUGfCGGfUfCfUfCAfUGfCGfUfCGAGfUGfUGAGfUfUfUAfCfCfUf
UfCGfUfC

ARC186 (SEQ ID NO: 4)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUf
UfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC187 (SEQ ID NO: 5)

40kDa PEG-- NH-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUf
UfUAfCfCfUmGfCmG-3T

Onde o PEG ramificado de 40 kDa é ,3-bis(mPEG-[20 kDa])-
propil-2-(4'-butamida)

ARC188 (SEQ ID NO: 6)

AGGAfCGAfUGfCGGfUfCfUfCAfUGfCGfUfCGAGfUGfUGAGfUfUfUAfCfCf
UfUfCGfUfC

ARC189 (SEQ ID NO: 7)

AGfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGf
UfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC250 (SEQ ID NO: 8)

GGfCGfCfCGfCGGfUfCfUfCAGGfCGfCfUGAGfUfCfUGAGfUfUfUAfCfCfU
GfCG

ARC296 (SEQ ID NO: 9)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AdCdCfUmGfCmG-3T

ARC297 (SEQ ID NO: 10)

**mCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAdCdCfUmGmCmG-
3T**

ARC331 (SEQ ID NO: 11)

dCmGdCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGdCmG

ARC332 (SEQ ID NO: 12)

dCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG

ARC333 (SEQ ID NO: 13)

fCmGdCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG

ARC334 (SEQ ID NO: 14)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfJmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGdCmG

ARC411 (SEQ ID NO: 15)

fCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG

ARC412 (SEQ ID NO: 16)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGmCmG

ARC413 (SEQ ID NO: 17)

mCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG

ARC414 (SEQ ID NO: 18)

mCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGmCmG

ARC415 (SEQ ID NO: 19)

fCmGfCdCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG

ARC416 (SEQ ID NO: 20)

fCmGfCfCGdCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG

ARC417 (SEQ ID NO: 21)

fCmGfCdCGdCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCfmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG

ARC418 (SEQ ID NO: 22)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGdCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG

ARC419 (SEQ ID NO: 23)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCTmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUA
fCfCfUmGfCmG

ARC420 (SEQ ID NO: 24)

fGmGfCfUGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGdCTmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUA
f1CfCtUmGfCmG

ARC421 (SEQ ID NO: 25)

fGmGfCfGGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfGfUmGmAmGTdCTmGmAmGTfUfUA
fCfCfUmGfCmG

ARC422 (SEQ ID NO: 26)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUA
fCfUfUmGfCmG

ARC423 (SEQ ID NO: 27)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUTA

fCfCfUmGfCmG

ARC424 (SEQ ID NO: 28)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTAFc
fCfUmGfCmG

ARC425 (SEQ ID NO: 29)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCTmGfCmG

ARC426 (SEQ ID NO: 30)

fCmGfCfCGfCmGmGmUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AdCdCfUmGfCmG

ARC427 (SEQ ID NO: 31)

fCmGfCmCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG

ARC428 (SEQ ID NO: 32)

fUmGfCfCGmCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfUmG

ARC429 (SEQ ID NO: 33)

fCmGfCmCGmCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG

ARC430 (SEQ ID NO: 34)

fGmGfCfUGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGmCfUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUf
UfUAfCfCfUmGfCmG

ARC431 (SEQ ID NO: 35)

fUmGfCfCGfUmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGfCmUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUf
UfUAfCfCfUmGfCm

ARC432 (SEQ ID NO: 36)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUf
UfUAfCfCfUmGfCmG

ARC433 (SEQ ID NO: 37)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfU
mGmAmGTdCTmGmAmGmUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC434 (SEQ ID NO: 38)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCfmGmAmGfUmUfU
AfCfCfUmGfCmG

ARC435 (SEQ ID NO: 39)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUmU
AfCfCfUmGfCmG

ARC436 (SEQ ID NO: 40)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGmUmUmU
AfCfCfUmGfCmG

ARC437 (SEQ ID NO: 41)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCmUmGfCmG

ARC438 (SEQ ID NO: 42)

fCmGfCfCdGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
UAfCfCfUmGfCmG

ARC439 (SEQ ID NO: 43)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCdGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
UAfCfCfUmGfCmG

ARC440 (SEQ ID NO: 44)

fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
dAfCfCfUmGfCmG

ARC457 (SEQ ID NO: 45)

**mGfCmGfUfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmAfCmGm
C**

ARC458 (SEQ ID NO: 46)

mGmGmGfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmCmCmC

ARC459 (SEQ ID NO: 47)

**mGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGm
C**

ARC473 (SEQ ID NO: 48)

**mGmGmAfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmG
fCmGfUfCfU-3T**

ARC522 (SEQ ID NO: 49)

**mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
GmCmC**

ARC523 (SEQ ID NO: 50)

**mGmGmCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
GmCmC**

ARC524 (SEQ ID NO: 51)

**mGmGmCmGdCdCGdCmGmGTdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
mGmCmC**

ARC525 (SEQ ID NO: 52)

**mGmGmCmGdCdCGdCmGmGTdCmUmCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGmUmCmUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
TmGdCmGmCmC**

ARC532 (SEQ ID NO: 53)

Biotina-

AGfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfUfUmGmAmGf
UfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC543 (SEQ ID NO: 54)

**mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
GmCmC**

ARC544 (SEQ ID NO: 55)

**mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUmCmUmCmAmGmGmCGfCfUmGmAmGmUmCmUmGmAmGfUfUfUAfCfCfU
mGfCmGmCmC**

ARC550 (SEQ ID NO: 56)

**fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUmAfcCfUmGfCmG-
3T**

ARC551 (SEQ ID NO: 57)

**fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-
3T**

ARC552 (SEQ ID NO: 58)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGTfU
fUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC553 (SEQ ID NO: 59)

**fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUmAfcCfUmGfCmG-
3T**

ARC554 (SEQ ID NO: 60)

**fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGTfUfUfUmAfcCfUmGfCmG-
3T**

ARC 657 (SEQ ID NO: 61)

20 kDa PEG-NH-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUf
UfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC 658 (SEQ ID NO: 62)

30 kDa PEG-NH-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUf
UfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC 672 (SEQ ID NO: 63)

NH2-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUf
UfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC706 (SEQ ID NO: 64)

10 kDa PEG-NH-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUf
UfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC1537 (SEQ ID NO: 65)

40kDa PEG-
 NHfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGf
 UfUfUAfCfCfUmGfCmG-3T

ARC1730) (SEQ ID NO: 66)

**PEG20K-NH-
 fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG-NH-
 PEG20K**

ARC1905 (SEQ ID NO: 67)

40K PEG-NH- -

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfUmGmAmGfUfUf
 UAfCfCfUmGfCmG-3T Onde o PEG ramificado de 40 kDa é 2,3-
 bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo

ARC243 (SEQ ID NO: 68)

GGfCGAfUfUAfCfUGGGAfCGGAfCfUfCGfCGAfUGfUGAGfCfCfCAGAfCGAf
 CfUfCGfCfC

ARC244 (SEQ ID NO: 69)

GGfCfUfUfCfUGAAGAfUfUAfUfUfUfCGfCGAfUGfUGAAfCfUfCfCAGAfCf
 CfCfC

A divulgação compreende adicionalmente os aptâmeros no Quadro 2 abaixo. Os aptâmeros no Quadro 2 são listados na direção 5' para 3' e representam a sequência de ribonucleótidos dos aptâmeros que foram selecionados sob as condições de dRmY SELEX™ proporcionadas. Nalgumas formas de realização da invenção derivadas a partir desta seleção (e conforme refletido na lista de sequências) as purinas (A e G) são desoxi e as pirimidinas (U e C) são 2'-OMe. Nalgumas formas de realização aptâmeros compreendem um *cap* (por exemplo, um dT 3'-invertido). Nalgumas formas de realização os aptâmeros compreendem um PEG.

Quadro 2 / Aptâmeros anti-C5 de dRmY

SEQ ID NO	ARC NO	Sequência
75	ARC913	GGGAGAGGAGAGAACGUUUCUACCUUGGUUGGCACAGCCCAUACAUACGACGGGUGGUAUCG AUCGUAUCAUGAUG
76	ARC874	CCUUGGUUUGGCACAGCCCAUACAUACGACGGG
81	ARC954	CGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGCCCAUACAUACGACGGGUGGUAUCG
91	--	GGGAGAGGAGAGAACGUUUCUACCUUGGUUGGCACAGCCCAUACAUACGACGGGUAUCG GUUACGACUAUGGUAUG
95	--	GGGAGAGGAGAGAACGUUUCUACCUUGGUUGGCACAGCCCAUACAUACGACGGGUAUCG UUACGACUAUGGUAUG
96	--	GGGAGAGGAGAGAACGUUUCUACCUUGGUUGGCACAGCCCAUACAUACGACGGGUAUCG GUUACGACUAUGGUAUG

Outros aptâmeros da invenção que ligam a proteína C5 do complemento são descritos abaixo no Exemplo 3. Os aptâmeros específicos de C5 são adicionalmente descritos nos Pedidos de Patente Provisórios US 60/544.542, 60/547.747, 60/581.685 e 60/608.048 (veja-se documento WO 05/079363).

Nalgumas formas de realização, os agentes terapêuticos de aptâmero da presente invenção têm grande afinidade e especificidade aos seus alvos enquanto reduzindo os efeitos secundários de eliminação das substituições de nucleótidos de ocorrência não natural dos agentes terapêuticos de aptâmeros no corpo de pacientes ou indivíduos. Nalgumas formas de realização, as composições terapêuticas contendo os agentes terapêuticos de aptâmero da presente invenção são isentos de ou têm menor quantidade de nucleótidos fluorados.

Os aptâmeros da presente invenção podem ser sintetizados utilizando quaisquer técnicas de síntese de oligonucleótido conhecidas na técnica, incluindo técnicas de síntese de oligonucleótido de fase sólida bem conhecidas na especialidade (veja-se, por exemplo, Froehler *et al.*, Nucl. Acid Res. 14:5399-5467 (1986) e Froehler *et al.*, Tet. Lett. 27:5575-5578 (1986)) e métodos de fase de solução, tais como métodos de síntese de triéster (veja-se, por exemplo, Sood *et al.*, Nucl. Acid Res. 4:2557 (1977) e Hirose *et al.*, Tet. Lett., 28:2449 (1978)).

A invenção também inclui a utilização dos aptâmeros anti-C5 da invenção com aptâmeros específicos para PDGF e/ou VEGF e/ou os seus recetores PDGFR e VEGFR cognatos, respetivamente, nos métodos da invenção de estabilizar, tratar e/ou prevenir distúrbios oculares. Desta maneira, os métodos descritos imediatamente acima podem ser utilizados para gerar aptâmeros da invenção para bloquear a ligação de um ligando (por exemplo, PDGF ou VEGF) com o seu alvo, tal como recetor cognato.

Exemplos de aptâmeros anti-PDGF para utilização nos métodos da invenção são divulgados no Pedido de Patente Internacional N° PCT/US2005/039975 (documento WO 2006/050498) depositado a 2 de Novembro de 2005, particularmente ARC513, ARC594, ARC127 e ARC404 descritos no mesmo.

Exemplos de aptâmeros específicos VEGF para utilização nos métodos da invenção são divulgados nas Patentes US N° 5.919.455, 5.932.462, 6.113.906, 6.011.020, 6.051.698 e 6.147.204. Por exemplo, um aptâmero particularmente útil para utilização no tratamento de distúrbios oculares em combinação com um agente anti-C5 da invenção seria EYE001 (previamente NX1838) na sua forma peguilada e não peguilada, particularmente injeção de pegaptanib de sódio (Macugen®, Eyetech Pharmaceuticals, Inc. e Pfizer, Inc. NY, NY).

A invenção também inclui a utilização de aptâmeros anti-C5 da invenção com aptâmeros para PDGF e/ou VEGF e/ou os seus recetores cognatos PDGFR e VEGFR, respetivamente nos métodos da invenção de estabilização, tratamento e/ou prevenção de distúrbios oculares.

Exemplos de aptâmeros anti-PDGF para utilização nos métodos da invenção são divulgados no Pedido de Patente Internacional N° PCT/US2005/039975 (documento WO 2006/050498) depositado em 2 de Novembro de 2005, particularmente ARC513, ARC594, ARC127 e ARC404 descritos nele.

Exemplos de aptâmeros específicos VEGF para utilização nos métodos da invenção são divulgados nas Patentes US N° 5.919.455, 5.932.462, 6.113.906, 6.011.020, 6.051.698 e 6.147.204. Por exemplo, um aptâmero particularmente útil para utilização no tratamento de distúrbios oculares em combinação com um aptâmero anti-complemento, particularmente um aptâmero anti-C5, da invenção seria EYE001 (previamente NX1838) na sua forma peguilada e na

peguilada, particularmente injeção de pegaptanib de sódio (Macugen®, Eyetech Pharmaceuticals, Inc. e Pfizer, Inc. NY, NY).

Composições Farmacêuticas

Esta divulgação também inclui composições farmacêuticas contendo um agente anti-C5, particularmente moléculas de aptâmero que ligam à proteína C5 do complemento, particularmente um aptâmero que liga à proteína C5 do complemento e previne a sua clivagem. As composições podem ser adequadas para utilização interna e incluem uma quantidade eficaz de um composto farmacologicamente ativo da invenção, em separado ou em combinação, com um ou mais portadores farmacêuticamente aceitáveis. Os compostos são especialmente utilizados já que têm muito baixa, se alguma, toxicidade.

As composições podem ser utilizadas para tratar ou prevenir uma patologia, tal como uma doença ou distúrbio, ou aliviar os sintomas de tal doença ou distúrbio num paciente. Por exemplo, as composições da presente invenção podem ser utilizadas para tratar ou prevenir DMRI não exsudativa.

As composições da invenção podem ser utilizadas para estabilizar DMRI de tipo não exsudativo ("seca").

As composições são úteis para administração a um indivíduo sofrendo de ou predisposto a, uma doença ou distúrbio relacionada ou derivada a partir de proteína C5 do complemento. As composições são especificamente úteis para administração a um indivíduo sofrendo de ou predisposto a, uma doença ou distúrbio de DMRI de tipo não exsudativo.

São proporcionadas composições para tratamento dos indivíduos tendo ou em risco de DMRI de tipo exsudativo. Nalgumas formas de realização, os indivíduos em risco são aqueles tendo drusas e/ou alterações na pigmentação da retina mas sem perda clínica de acuidade visual. As drusas

são detetadas utilizando um oftalmoscópio, aparecendo tipicamente como manchas e partículas amarelas contra o fundo vermelho da retina. A perda clínica de acuidade visual é a demonstração de uma redução de 1 a 3 linhas na visão utilizando o Gráfico de Estudo do Tratamento Precoce da Retinopatia Diabética ("gráfico de ETDRS"). Outras alterações na visão associadas à degeneração macular incluem distorções e/ou pontos cegos (escotoma) detetados utilizando uma grelha de Amsler, alterações na adaptação ao escuro (diagnóstico de saúde de bastonetes) ou alterações na interpretação da cor (diagnóstico de saúde da célula cone). Nalgumas formas de realização, os indivíduos em risco são aqueles tendo uma variação no fator H do complemento do indivíduo em comparação com o tipo selvagem. Veja-se, por exemplo, as variações descritas por Edwards *et al.*, Science vol 308, pp421- 422 (2005), Hageman, G. *et al.*, PNAS, vol.102, pp. 7227-7231 (2005), e Haines, J. *et al.*, Science, vol. 308, pp 419-421 (2005). Nalgumas formas de realização os indivíduos em risco são aqueles tendo uma combinação de drusas, nenhuma perda de acuidade visual e uma variação no fator H do complemento. Nalgumas formas de realização, os indivíduos em risco são aqueles em que são detetadas drusas. Nalgumas formas de realização, os indivíduos em risco a serem tratados são os em que são detetadas drusas e existe uma perda clínica de acuidade visual e/ou outras alterações na visão.

As composições podem ser utilizadas num método para tratar um paciente ou indivíduo que tem DMRI de tipo exsudativo. Os métodos envolvem administrar ao paciente ou indivíduo um aptâmero específico de C5 ou uma composição compreendendo o mesmo, de tal forma que o aptâmero anti-C5liga à proteína C5 do complemento, para que a ligação à proteína C5 do complemento altere a sua função biológica, por exemplo, prevenindo a sua clivagem *in vivo*, tratando consequentemente a patologia mediada por C5 (DMRI de tipo

não exsudativo). A ligação do aptâmero específico de C5 reduz o nível de expressão de VEGF e/ou PDGF e/ou bFGF e/ou outros fatores de crescimento que estimulam o crescimento de células endoteliais, particularmente no tecido retinal, células RPE, vasos coroidais e/ou capilares retiniais, em paciente, tratando conseqüentemente distúrbios mediados por VEGF e/ou PDGF, particularmente distúrbios de neovascularização ocular, tal como DMRI.

Numa forma de realização, o aptâmero anti-C5 da invenção é administrado por via ocular ou periocular a um indivíduo numa quantidade suficiente para reduzir o nível de expressão de VEGF e/ou PDGF ocular *in vivo*. Numa forma de realização particular dos métodos da invenção, o indivíduo ao qual o aptâmero anti-complemento, particularmente um aptâmero anti-C5 da invenção, é administrado é identificado como tendo ou em risco de ter um distúrbio de neurovascularização ocular pelo qual a expressão reduzida de VEGF e/ou PDGF auxilia na prevenção, estabilização e/ou redução de pelo menos um sintoma do distúrbio de neurovascularização ocular.

O paciente ou indivíduo tratado através dos métodos desta invenção pode ser um vertebrado, mais particularmente um mamífero, ou mais particularmente, um ser humano.

Na prática, os aptâmeros específico de C5 da invenção ou os seus sais ou pró-fármacos farmacologicamente aceitáveis são administrados em quantidades que serão suficientes para exercer a sua atividade biológica desejada, por exemplo, inibição da ligação do aptâmero alvo ao seu recetor, prevenção da clivagem de uma proteína alvo.

Um aspeto da invenção compreende uma composição de aptâmero da invenção em combinação com outros tratamentos para distúrbios do complemento mediados por C5. Numa forma de realização a presente invenção descreve uma composição de aptâmero da invenção em combinação com outros tratamentos para distúrbios oculares mediados pelo

complemento. A composição de aptâmero da invenção pode conter, por exemplo, mais do que um aptâmero. Nalguns exemplos, uma composição de aptâmero da invenção, contendo um ou mais compostos da invenção, é administrada em combinação com uma outra composição útil, tal como um agente anti-inflamatório, um imunossupressor, um agente antiviral ou semelhantes. Além disso, os compostos da invenção podem ser administrados em combinação com um agente citotóxico, citostático ou quimioterapêutico, tais como um agente alquilante, anti-metabólito, inibidor mitótico ou antibiótico citotóxico, conforme descrito anteriormente. Em formas de realização particulares, o agente anti-C5 da invenção, tal como em geral, as formas farmacêuticas atualmente disponíveis dos agentes terapêuticos conhecidos para utilização em tais combinações serão adequadas.

"Terapêutica de combinação" (ou "co-terapêutica") inclui a administração da composição de aptâmero específico de C5 da invenção e pelo menos um segundo agente como parte de um regime de tratamento específico destinado a proporcionar o efeito benéfico a partir da co-ação destes agentes terapêuticos. O efeito benéfico da combinação inclui, mas não está limitado a, co-ações farmacocinéticas ou farmacodinâmicas resultantes a partir da combinação de agentes terapêuticos. A administração dos agentes terapêuticos em combinação é tipicamente realizada durante um período de tempo definido (normalmente minutos, horas, dias ou semanas dependendo da combinação selecionada). Nalgumas formas de realização, o segundo agente pode ser um agente anti-VEGF e/ou um agente anti-PDGF.

Em formas de realização dos métodos descritos acima, onde o método compreende adicionalmente a etapa de administrar ao indivíduo um agente anti-VEGF, o agente anti-VEGF pode ser selecionado a partir do conjunto consistindo em: uma molécula de ácido nucleico, um

aptâmero, uma molécula anti-sentido, uma molécula de ARNi, uma proteína, um péptido, um péptido cíclico, um anticorpo ou fragmento de anticorpo, um açúcar, um polímero, e uma molécula pequena.

Em formas de realização dos métodos descritos acima, onde o método compreende adicionalmente a etapa de administrar ao indivíduo um agente anti-PDGF, o agente anti-PDGF pode ser selecionado a partir do conjunto consistindo numa molécula de ácido nucleico, um aptâmero, uma molécula anti-sentido, uma molécula de ARNi, uma proteína, um péptido, um péptido cíclico, um anticorpo ou fragmento de anticorpo, um açúcar, um polímero, e uma molécula pequena.

Nalgumas formas de realização dos métodos descritos acima, onde o método compreende adicionalmente administrar um agente anti-vascular ao indivíduo o agente antivascular é um derivado de porfirina. Nalgumas formas de realização o derivado de porfirina, é vertoporfina para injeção (Visudyne®, Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ). Nalgumas formas de realização, o método compreende adicionalmente a etapa de ativar o derivado de porfirina com luz *laser*.

"Terapêutica de combinação" pode, mas geralmente não é, ser destinada a englobar a administração de dois ou mais destes agentes terapêuticos como parte de regimes de monoterapêutica separados que resultam incidental e arbitrariamente nas combinações da presente invenção. A "terapêutica de combinação" destina-se a abranger a administração destes agentes terapêuticos de uma maneira sequencial, isto é, em que cada agente terapêutico é administrado em diferentes tempos, bem como administração destes agentes terapêuticos, ou pelo menos dois dos agentes terapêuticos, de uma maneira substancialmente simultânea. Pode ser realizada administração substancialmente simultânea, por exemplo, administrando ao indivíduo uma

cápsula adequada com uma razão fixa de cada agente terapêutico ou em cápsulas múltiplas, únicas para cada um dos agentes terapêuticos. Noutra forma de realização, a administração substancialmente simultânea pode ser realizada, por exemplo, administrando ao indivíduo uma seringa única com uma razão fixa de cada agente terapêutico ou em cápsulas múltiplas, únicas para cada um dos agentes terapêuticos.

A administração sequencial ou substancialmente simultânea de cada agente terapêutico pode ser efetuada através de qualquer via adequada incluindo, mas não limitada a, vias tópicas, vias orais, vias intravenosas, vias intramusculares, vias oculares e absorção direta por meio dos tecidos da membrana mucosa. Os agentes terapêuticos podem ser administrados através da mesma via ou através de diferentes vias. Por exemplo, um primeiro agente terapêutico da combinação selecionada pode ser administrado através de injeção, enquanto os outros agentes terapêuticos da combinação podem ser administrados por via tópica.

Alternativamente, por exemplo, todos os agentes terapêuticos podem ser administrados por via tópica ou todos os agentes terapêuticos podem ser administrados através de injeção. A sequência em que os agentes terapêuticos são administrados não é estreitamente crítica, a menos que de outra forma indicado. A "terapêutica de combinação" também pode abranger a administração dos agentes terapêuticos conforme descrito acima em combinação adicional com outros ingredientes biologicamente ativos. Onde a terapêutica de combinação compreende adicionalmente um tratamento não de fármaco, o tratamento não de fármaco pode ser conduzido em qualquer tempo adequado, desde que seja alcançado um efeito benéfico da co-ação da combinação dos agentes terapêuticos e tratamento não de fármaco. Por exemplo, em casos adequados, o efeito benéfico ainda é

alcançado quando o tratamento não de fármaco é temporariamente removido a partir da administração dos agentes terapêuticos, talvez por dias ou mesmo semanas.

As composições terapêuticas ou farmacológicas da presente invenção geralmente compreenderão uma quantidade eficaz do(s) componente(s) ativo(s) da terapêutica, dissolvidos ou dispersos num meio farmaceuticamente aceitável. Meios e veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes da absorção e semelhantes. A utilização de tais meios e agentes para substâncias ativas farmacêuticas é bem conhecido na técnica. Ingredientes ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições terapêuticas da presente invenção.

A preparação de composições farmacêuticas ou farmacológicas será conhecida por parte dos peritos na especialidade à luz da presente descrição. Tipicamente, tais composições podem ser preparadas como injetáveis, tanto como soluções líquidas como suspensões; formas sólidas adequadas para solução em, ou suspensão, líquido antes da injeção; como comprimidos ou outros sólidos para administração oral; como cápsulas de libertação por tempo; ou em qualquer outra forma atualmente utilizada, incluindo colírios, cremes, loções, pomadas, inalantes e semelhantes. A utilização de formulações estéreis, tais como lavagens à base de solução salina, por parte de cirurgiões, médicos ou profissionais de saúde para tratar uma área particular no campo de operação também pode ser particularmente útil. As composições também podem ser administradas por meio de microdispositivos, micropartículas ou esponjas.

Após formulação, os agentes terapêuticos serão administrados de uma maneira compatível com a formulação farmacêutica, e numa quantidade tal conforme

farmacologicamente eficaz. As formulações são facilmente administradas numa variedade de formas farmacêuticas, tais como o tipo de soluções injetáveis descrito acima, mas também podem ser utilizadas cápsulas de libertação de fármaco e semelhantes.

Neste contexto, a quantidade de ingrediente ativo e volume da composição a ser administrada depende do animal hospedeiro a ser tratado. Quantidades precisas de composto ativo necessárias para a administração dependem do julgamento do profissional médico e são peculiares para cada indivíduo.

É tipicamente utilizado um volume mínimo de uma composição necessário para dispersar os compostos ativos. Os regimes adequados para administração também são variáveis, mas podem ser tipificados administrando inicialmente o composto e monitorizando os resultados e dando então doses controladas adicionais em intervalos adicionais.

Por exemplo, para administração oral na forma de um comprimido ou cápsula (por exemplo, uma cápsula de gelatina), o componente do fármaco ativo pode ser combinado com um veículo inerte oral, não tóxico farmacologicamente aceitável, tal como etanol, glicerol, água e semelhantes. Além disso, quando desejado ou necessário também podem ser incorporados na mistura agentes aglutinantes, lubrificantes, desintegrantes e corantes adequados. Aglutinantes adequados incluem amido, silicato de magnésio e alumínio, pasta de amido, gelatina, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio e/ou polivinilpirrolidona, açúcares naturais, tais como glicose ou beta-lactose, adoçantes de milho, gomas naturais e sintéticas, tais como acácia, tragacanto ou alginato de sódio, polietilenoglicol, ceras e semelhantes. Lubrificantes utilizados nestas formas farmacêuticas incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio,

cloreto de sódio, sílica, talco, ácido esteárico, o seu sal de magnésio ou cálcio e/ou polietilenoglicol e semelhantes. Desintegrantes incluem, sem limitação, amido, metilcelulose, ágar, bentonite, amidos de goma xantana, ágar, ácido algínico ou o seu sal de sódio ou misturas efervescentes e semelhantes. Diluentes, incluem, por exemplo, lactose, dextrose, sacarose, manitol, sorbitol, celulose e/ou glicina.

Os compostos da invenção também podem ser administrados em formas farmacêuticas orais tais como comprimidos ou cápsulas de libertação cronometrada e, pílulas, pós, grânulos, elixires, tinturas, suspensões, xaropes e emulsões de libertação sustentada.

As composições injetáveis são preferentemente soluções ou suspensões isotónicas aquosas, e são vantajosamente preparados supositórios a partir de emulsões ou suspensões gordurosas. As composições podem ser esterilizadas e/ou conter adjuvantes, tais como agentes conservantes, estabilizantes, humidificantes ou emulsificantes, promotores de solução, sais para regular a pressão osmótica e/ou tampões. Além disso, também podem conter outras substâncias terapeuticamente valiosas. As composições são preparadas de acordo com métodos de mistura convencionais, de granulação ou de revestimento, respetivamente, e contêm tipicamente cerca de 0,1 a 75 %, preferentemente cerca de 1 a 50 % do ingrediente ativo.

As composições líquidas, particularmente injetáveis podem, por exemplo, ser preparadas através de dissolução, dispersão, etc. O composto ativo é dissolvido ou misturado com um solvente farmacêuticamente puro, ta como, por exemplo, água, solução salina, dextrose aquosa, glicerol, etanol, e semelhantes, para desta forma formar a solução ou suspensão injetável. Adicionalmente, podem ser formuladas formas sólidas adequadas para dissolver no líquido antes da injeção.

Os compostos da presente invenção podem ser administrados de forma intravenosa (tanto em bólus como através de infusão), intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular, todas utilizando formas bem conhecidas por parte de um perito nas técnicas farmacêuticas. Podem ser preparados injetáveis em formas convencionais, tanto como soluções como suspensões líquidas.

A administração injetável parentérica é geralmente utilizada para injeções e infusões subcutâneas, intramusculares ou intravenosas. Adicionalmente, uma abordagem para administração parentérica emprega a implantação de um sistema de libertação lenta ou prolongada, que garante que o nível de dosagem constante seja mantido, de acordo com a Patente US N° 3.710.795.

Além disso, os compostos preferidos para a presente invenção podem ser administrados na forma intranasal por meio de utilização tópica de veículos intranasais adequados, inalantes, ou por meio de vias transdérmicas, utilizando as formas de adesivos de pele transdérmicos bem conhecidas por parte de um perito na especialidade. Para ser administrado na forma de um sistema de administração dérmico, a administração da dosagem será, certamente, contínua em vez de intermitente ao longo de todo o regime de dosagem. Outras preparações tópicas preferidas incluem cremes, unguentos, loções, pulverizadores de aerossóis e géis, em que a concentração de ingrediente ativo pode tipicamente variar de 0,01 % a 15 % p/p ou p/v.

Para composições sólidas, podem ser utilizados excipientes incluem graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glicose, sacarose, carbonato de magnésio e semelhantes. O composto ativo definido anteriormente, também pode ser formulado como supositórios utilizando, por exemplo, polialquilenoglicóis, por exemplo, propilenoglicol, como o portador. Nalgumas formas de

realização, os supositórios são vantajosamente preparados a partir de emulsões ou suspensões gordurosas.

Os compostos da presente invenção também podem ser administrados na forma de sistemas de distribuição de lipossomas, tais como vesículas unilamelares pequenas, vesículas lamelares grandes e vesículas multilamelares. Os lipossomas podem ser formados a partir de uma variedade de fosfolípidos, contendo colesterol, estearilamina ou fosfatidilcolinas. Nalgumas formas de realização, uma película de componentes de lípido é hidratada com uma solução aquosa do fármaco para formar uma camada de lípido encapsulando o fármaco, conforme descrito na Patente US N° 5.262.564. Por exemplo, a molécula de aptâmero conforme descrito no presente documento pode ser proporcionada como um complexo com um composto lipofílico ou não imunogénico, composto de elevada massa molecular construído utilizando métodos conhecidos na técnica. Um exemplo de complexos associados a ácido nucleico é proporcionado na Patente US N° 6.011.020.

Os compostos da presente invenção também podem ser acoplados com polímeros solúveis como veículos de fármaco visáveis. Tais polímeros podem incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, poliidroxiopropil-metacrilamida-fenol, poliidroxiethylaspanamidafenol ou polietilenooxidepolilisina substituída por resíduos de palmitoilo. Além disso, os compostos da presente invenção podem ser acoplados a um tipo de polímeros biodegradáveis úteis para obter libertação controlada de um fármaco, por exemplo, ácido polilático, caprolactona poliepsilon, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetais, polidiidropiranos, policianoacrilamidas e copolímeros em bloco de hidrogéis reticulados ou antipáticos.

Numa forma de realização preferida, os compostos da presente invenção podem ser administrados ao compartimento

ocular através de uma injeção intravítrea, periocular, intracameral, subconjuntival ou trans-escleral na cavidade ocular ou diretamente no(s) tecido(s) ocular(es) ou periocular(es). Os compostos da invenção podem ser injetados no espaço subtenoniano ou no espaço retrobulbar. Os compostos da invenção também podem ser administrados ao compartimento ou tecido ocular por meio de fluido sistêmico e fluido para o olho e seus tecidos e então é administrado através de injeção parentérica sistêmica, através das vias intravenosa, intramuscular ou subcutânea de distribuição. A administração subconjuntival, intravítrea ou trans-escleral de composições farmacêuticas da invenção pode ser utilizada como um suplemento para a administração sistêmica de um terapêutico para o tratamento de doenças oculares e/ou doenças sistêmicas com manifestações oculares. Nalgumas formas de realização dos métodos da invenção para estabilizar, tratar e/ou prevenir retinopatia diabética e/ou doença de Behcet, o aptâmero anti-complemento não é administrado por via sistêmica, é preferentemente administrado por via ocular.

Os compostos da presente invenção também podem ser administrados ao compartimento ou tecido ocular na formulação de gel ou polímero de libertação prolongada de depósito ou através de implantação cirúrgica de um sistema de polímero de microtamanho biodegradável, por exemplo, microdispositivo, micropartícula ou esponja, ou outros dispositivos transesclerais de libertação lenta, implantados durante o tratamento de uma doença oftálmica, ou através de um dispositivo de distribuição ocular, por exemplo, dispositivo de distribuição prolongada de lentes de contato de polímero. Os compostos da invenção também podem ser administrados ao compartimento ou tecido ocular topicamente, por exemplo, na forma de colírio, na forma de uma lente de contato carregada com o composto da invenção, ou através de iontoforese utilizando corrente elétrica para

conduzir o fármaco da superfície para a parte posterior do olho.

Se desejado, a composição farmacêutica a ser administrada também pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares não tóxicas tais como agentes humidificantes e emulsificantes, agentes de tamponamento de pH, e outras substâncias, tais como, por exemplo, acetato de sódio, e oleato de trietanolamina.

O regime de dosagem utilizando os aptâmeros é selecionado de acordo com uma variedade de fatores, incluindo tipo, espécie, idade, massa, sexo e condição médica do paciente; a gravidade da condição a ser tratada; a via de administração; a função renal e hepática do paciente; e o aptâmero particular ou sal do mesmo empregue. Um médico ou veterinário perito na especialidade pode prontamente determinar e prescrever a quantidade eficaz do fármaco necessária para prevenir, conter ou interromper o progresso da condição.

As dosagens orais das composições de aptâmeros da presente invenção, quando utilizadas para os efeitos indicados, variarão entre cerca de 0,05 a 7500 mg/dia por via oral. As composições são preferentemente proporcionadas na forma de comprimidos classificados contendo 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100,0, 250,0, 500,0 e 1000,0 mg de ingrediente ativo. Os compostos da presente invenção podem ser administrados numa dose diária única ou a dose diária total pode ser administrada em doses divididas de duas, três ou quatro vezes ao dia.

As dosagens infundidas, dosagens intranasais e dosagens transdérmicas da composição de aptâmeros da presente invenção variarão entre 0,05 a 7500 mg/dia. As dosagens subcutâneas, intravenosas e intraperitoneais da composição de aptâmeros da presente invenção variarão entre 0,05 a 3800 mg/dia.

As dosagens oculares da composição de aptâmeros da

presente invenção variarão entre 0,001 a 10 mg/olho administrados ocularmente, por exemplo, através de injeção intravítrea, de uma vez por semana até uma vez a cada três meses ou através de dispositivo ou formulação de libertação prolongada.

Níveis plasmáticos eficazes dos compostos de aptâmero da presente invenção variam de 0,002 mg/ml a 50 mg/ml. Níveis oculares eficazes dos compostos de aptâmero da invenção podem variar de 20 nM a 250 µM.

Eficácia do tratamento

Distúrbios neovasculares

A eficácia do tratamento de um distúrbio neovascular, por exemplo, DMRI, particularmente DMRI de tipo exsudativo ou retinopatia diabética, é avaliada através de qualquer método aceite de medir se a angiogénese é mais lenta ou diminuída. Isto inclui observação direta e avaliação indireta tal como avaliando sintomas subjetivos ou indicadores fisiológicos objetivos. A eficácia do tratamento, por exemplo, pode ser avaliada com base na prevenção, estabilização e/ ou reversão da neovascularização, microangiopatia, vazamento vascular ou edema vascular ou qualquer combinação dos mesmos. A eficácia do tratamento para avaliar a supressão de um distúrbio neovascular ocular também pode ser definida em termos de estabilização ou melhora da acuidade visual.

Na determinação da eficácia de um agente anti-C5 em separado ou em combinação com um agente anti-VEGF e/ou agente anti-PDGF na estabilização, reduzindo um sintoma e/ou prevenindo um distúrbio neovascular ocular, pacientes também podem ser clinicamente avaliados por parte de um oftalmologista vários dias após injeção e imediatamente antes da próxima injeção. Acuidades visuais por ETDRS, fotografia Kodachrome e angiografia de fluoresceína também podem ser realizados mensalmente.

Na determinação da eficácia de um aptâmero anti-

complemento em separado ou em combinação com um agente anti-VEGF e/ou agente anti-PDGF na estabilização, reduzindo um sintoma e/ou prevenindo um distúrbio neovascular ocular, pacientes também podem ser clinicamente avaliados por um oftalmologista vários dias após injeção e logo antes da próxima injeção. Acuidades via suais ETDRS, fotografia de fundo, tomografia de coerência ótica e angiografia de fluoresceína também podem ser realizados mensalmente.

Por exemplo, de maneira a estimar a eficácia de um agente anti-C5, particularmente um aptâmero específico de C5 em separado ou em combinação com um agente anti- VEGF e/ou um agente anti-PDGF, para tratar a neovascularização ocular, são conduzidos estudos envolvendo a administração de injeções intravítreas tanto únicas quanto múltiplas de um agente anti-C5, particularmente um aptâmero específico de C5 em separado ou em combinação com um agente anti-VEGF e/ou um agente anti-PDGF em pacientes sofrendo de neovascularização subfoveal coroidal secundária à degeneração macular relacionada com a idade de acordo com métodos padrão bem conhecidos na técnica oftalmológica. Pacientes com neovascularização subfoveal coroidal (CNV) secundária à degeneração macular relacionada com a idade (DMRI) podem receber uma única injeção intravítrea de um agente anti-C5, particularmente um aptâmero específico de C5 e/ou um aptâmero específico de VEGF e/ou um aptâmero específico de PDGF. A eficácia é monitorizada, por exemplo, através de avaliação oftalmológica e/ou angiografia de fluoresceína. Pacientes mostrando visão estável ou melhorada três meses após o tratamento, por exemplo, que demonstram uma melhoria de 3 linhas ou mais na visão no quadro ETDRS, são tomados como recebendo uma dosagem eficaz.

EXEMPLO 1

Atividade do Aptâmero Anti-C5 nas Vias do Complemento Clássica e Alternativa

Exemplo 1A: Ensaio de Hemólise.

O teste CH50 mede a capacidade do sistema complemento numa amostra de teste de soro de lisar 50 % das células numa suspensão padronizada de eritrócitos de ovelha revestidos com anticorpo. Uma solução de 0,2 % de soro humano foi misturada com eritrócitos de ovelha revestidos com anticorpo (Diamedix EZ Complement CH50 Kit, Diamedix Corp., Miami, FL) na presença ou ausência de vários aptâmeros anti-C5. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo do *kit* em solução salina tamponada com veronal contendo cálcio, magnésio e gelatina a 1 % (tampão de complemento GVB⁺⁺) e incubado durante 30 minutos a 37 °C. Após incubação, as amostras foram centrifugadas para precipitar eritrócitos intactos. A densidade ótica a 412 nm (OD₄₁₂) do sobrenadante foi lida para quantificar a libertação de hemoglobina solúvel, que é proporcional à extensão da hemólise (Green *et al.*, (1995) Chem. Biol. 2:683-95). Para verificar que os aptâmeros bloquearam a ativação de C5, alguns sobrenadantes de hemólise foram analisados para a presença de C5a e C5b-9 por ELISA (C5b-9 ELISA *kit*, Quidel, San Diego, CA; C5a ELISA *kit*, BD Biosciences, San Diego, CA) seguindo o protocolo do *kit* ELISA.

A adição de um aptâmero anti-C5 não PEGuilado (ARC186) (SEQ ID NO: 4) à mistura de reação inibiu a hemólise de uma maneira dependente da dose, conforme apresentado no gráfico da Figura 7A, com um CI₅₀ de 0,5 ± 0,1 nM, (veja-se Figura 7B), um valor que é consistente com o K_D determinado através de filtração com nitrocelulose. Em concentrações muito altas de aptâmero (>10 nM), a extensão da hemólise foi essencialmente indistinguível do fundo (nenhum soro adicionado), indicando que ARC186 (SEQ ID NO: 4) foi capaz de bloquear completamente a atividade do complemento. A conjugação do aptâmero ARC186 (SEQ ID NO: 4) com grupos de PEG de 20 kDa (ARC657; SEQ ID NO: 61), 30 kDa (ARC658; SEQ

ID NO: 62), ramificado de 40 kDa (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida) (ARC187; SEQ ID NO: 5), ramificado de 40 kDa (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo) (ARC1905; SEQ ID NO: 67), linear de 40 kDa (ARC1537; SEQ ID NO: 65), e linear de 2x20 kDa (ARC1730; SEQ ID NO: 66) não teve nenhum efeito na atividade inibidora do aptâmero no ensaio de hemólise CH50 (Figura 7A-Figura 7D).

Num estudo adicional, a atividade inibidora do aptâmero PEGuilado anti-C5 ARC1905 (ramificado de 40 kDa (2,3-bis(mPEG-(20 kDa))-propil-1-carbamoilo); SEQ ID NO: 67) foi comparada com o seu precursor não PEGuilado, ARC627 (SEQ ID NO: 63) que contém uma amina 5-terminal, no ensaio de hemólise CH50 descrito acima. Uma solução de soro humano (Innovative Research, Southfield, MI) foi misturada com eritrócitos de ovelha revestidos com anticorpo (Kit Diamedix EZ Complement CH50, Diamedix Corp., Miami, FL) na presença ou ausência de várias concentrações de ARC1905 e ARC627, respetivamente, de tal forma que a concentração final do soro em cada ensaio fosse 0,1 %, e o ensaio foi realizado de acordo com o protocolo de recomendação do fabricante. As reações de hemólise foram incubadas durante 1 hora a 3 °C com agitação para garantir que as células permanecessem em suspensão. No final da incubação, as células intactas foram precipitadas através de centrifugação (2.000 rpm, 2 min., temperatura ambiente), 200 µL de sobrenadante foram transferidos para uma placa de poliestireno de fundo reto (VWR, cat n.º 62409-003). A densidade ótica a 415 nm (OD_{415}) do sobrenadante foi lida para quantificar a libertação de hemoglobina solúvel. A % de inibição em cada concentração de aptâmero medida foi calculada utilizando a equação % de inibição = $100 - 100 \times (A_{amostra} - A_{sem\ soro}) / (A_{sem\ aptâmero} - A_{sem\ soro})$. onde $A_{amostra}$ é a absorvância da amostra em concentrações variadas de aptâmero, $A_{sem\ soro}$ é a absorvância devido à hemólise de fundo na ausência de soro (100 % de controlo de inibição) e

$A_{\text{sem aptâmero}}$ é a absorvância devido à atividade do complemento basal na ausência de aptâmero (0 % de controlo de inibição). Os valores de CI_{50} foram determinados a partir de um gráfico de % de inibição frente a [inibidor] utilizando a equação % de inib = (% de inib)_{máxima} x [inibidor]ⁿ / (CI_{50}^n + [inibidor]ⁿ) + fundo. Os valores de CI_{90} e CI_{99} foram calculados a partir dos valores de CI_{50} utilizando as equações $CI_{90} = CI_{50} \times [90/(100-90)]^{1/n}$ e $CI_{90} = CI_{50} \times [99/(100-99)]^{1/n}$. Os valores de CI_{50} para ARC1905 e ARC627 neste estudo paralelo foram $0,648 \pm 0,0521$ e $0,913 \pm 0,0679$ respetivamente (veja-se também Figura 58) confirmando adicionalmente que a PEGuilação teve pouco, se qualquer, efeito sobre a função do aptâmero.

A análise ELISA de sobrenadantes de hemólise indicou que esta inibição funcional teve correlação com o bloqueio da libertação de C5a. Consequentemente, os dados de hemólise mostram que ARC186 (SEQ ID NO: 4), e os seus conjugados PEGuilados, são inibidores do complemento altamente potentes que funcionam bloqueando a ativação de C5 catalizada por convertase.

Os ensaios de hemólise com material não PEGuilado indicaram que o aptâmero anti-C5 não tem reação cruzada com C5 de numerosas espécies de primatas, incluindo rato, porquinho-da-índia, cão e porco. Contudo, foi observada atividade inibidora significativa em seleções de soro de primata, incluindo soro de macaco cinomolgo, macaco *rhesus* e chimpanzé. A eficácia *in vitro* do aptâmero anti-C5 foi adicionalmente investigada no soro de cinomolgo utilizando ARC658 (SEQ ID NO: 62), o análogo de PEG de 30 kDa de C186 (SEQ ID NO: 4). Numa comparação lado a lado (n = 3), ARC658 inibiu a atividade do complemento humano com um CI_{50} de $0,21 \pm 0,0$ nM e atividade do complemento cinomolgo com um CI_{50} de $1,7 \pm 0,4$ nM (Figura 8). Consequentemente ARC658 (SEQ ID NO: 62) é 8 ± 3 vezes menos potente no soro de cinomolgo comparado com o humano através desta medição.

Num estudo relacionado, os efeitos do aptâmero PEGuilado anti-C5 ramificado de 40 kDa (2,3 bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamóilo), ARC1905 (SEQ ID NO: 67) na ativação da via do complemento clássico conforme ensaiado através de hemólise de eritrócito de ovelha foram investigados na presença de soro humano (Innovative Research, Southfield, MI), macaco cinomolgo (Bioreclamation, Hicksville, NY), ou rato (Bioreclamation, Hicksville, NY). Estes ensaios foram realizados em soro altamente diluído, 0,1 % para humano e macaco cinomolgo e 0,3 % para rato, sob as mesmas condições que as utilizadas para comparar os efeitos inibidores de ARC 1905 contra ARC672 na hemólise de eritrócito de ovelha conforme descrito diretamente acima. Numa comparação lado a lado, a inibição completa (90-99 %) da atividade do complemento *in vitro* foi alcançada com ARC1905 tanto em soros humanos como de macacos cinomolgos onde ARC1905 apresentou pouca a nenhuma atividade inibidora específica na amostra de complemento de rato (Figura 59A). Semelhante ao ARC658, ARC1905 foi ~10 vezes menos potente contra a atividade do complemento de cinomolgo nas condições do ensaio, conforme refletido nos valores de CI_{90} e CI_{99} relatados na Figura 59B.

Ensaio de Ligação de Filtro de Nitrocelulose. Os aptâmeros individuais foram marcados com ^{32}P no terminal 5' por meio de incubação com γ - ^{32}P -ATP e polinucleótido cinase (New England Biolabs, Beverly, MA). O aptâmero radioetiquetado foi purificado para fora do ATP livre através de filtração em gel seguido por eletroforese em gel de poliacrilamida. Para medir a afinidade do aptâmero anti-C5, aptâmero radioetiquetado ($\leq 10 \mu M$) foi incubado com concentrações crescentes (0,05 - 100 nM) de proteína C5 purificada (Quidel, San Diego, CA) em solução salina tamponada de fosfato contendo 1 mM de $MgCl_2$ a temperatura ambiente (23 °C) e 37 °C, durante 15 minutos e intervalos

de tempo de 4 horas. As reações de ligação foram analisadas através de filtração com nitrocelulose utilizando um tubo de distribuição de filtração a vácuo de 96 poços *dot-blot* Minifold (Schleicher & Schnell, Keene, NH). Foi utilizado um meio de filtração de três camadas, consistindo (do topo para a base) em nitrocelulose Protran (Schleicher & Schuell), *nylon* Hybond-P (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) e papel de gel *blot* GB002 (Schleicher & Schuell). A camada de nitrocelulose, que liga seletivamente a proteínas sobre ácidos nucleicos, reteve preferentemente o aptâmero anti-C5 no complexo com um ligando de proteína, enquanto aptâmero anti-C5 não complexado passou através da nitrocelulose e aderiu-se ao *nylon*. O papel de gel *blot* foi incluído simplesmente como um meio de suporte para os outros filtros. Após filtração, as camadas do filtro foram separadas, secas e expostas num ecrã de fósforo (Amersham Biosciences) e quantificadas utilizando um sistema de formação de imagem Storm 860 Phosphorimager® blot (Amersham Biosciences).

Conforme apresentado na Figura 9 e Figura 10, concentrações crescentes de C5 melhoram a proporção de ARC186 capturado na membrana de nitrocelulose. A dependência do ARC186 ligado nas concentrações crescentes de C5 é bem descrita através de um modelo de ligação de único sítio ($C5 + ARC186 \leftrightarrow C5 \cdot ARC186$; % ligado = $C_{max} / (1 + K_D / [C5])$; C_{max} é a % máxima ligada na saturação $[C5]$; K_D é a constante de dissociação). As curvas de ligação de ARC186 a duas temperaturas após tanto incubação de 15 minutos como de 4 horas de são apresentadas nas figuras 9 e 10, respetivamente. Após 15 minutos de incubação, as curvas de ligação de ARC 186 a 23 e 37 °C são essencialmente indistinguíveis no erro, ajustando-se com valores de K_D de 0,5 - 0,6 nM (Figura 9). As diferenças entre as curvas de ligação a 23 e 37 °C tornam-se mais pronunciadas quando o tempo de incubação é estendido. Após incubação de 4 horas

(Figura 10), o K_D observado a 23 °C diminui para $0,08 \pm 0,01$ nM, enquanto o K_D observado a 37 °C permanece inalterado ($0,6 \pm 0,1$ nM).

Para demonstrar a base para a necessidade de incubação longa à temperatura ambiente, a afinidade a esta temperatura foi adicionalmente explorada utilizando métodos cinéticos. A taxa da reação reversa descrevendo a dissociação de C5·ARC186 é $v_{rev} = k_{-1}[C5 \cdot ARC186]$, onde v_{rev} é a taxa (unidades de $M \text{ min}^{-1}$) e k_{-1} é a constante da taxa de dissociação de primeira ordem (unidades de $M^{-1} \text{ min}^{-1}$). A taxa da reação direta descrevendo a formação do complexo C5·ARC186 é $v_{for} = k_1[C5][ARC 186]$, onde v_{for} é a taxa (unidades de $M \text{ min}^{-1}$) e k_1 é a constante da taxa de dissociação de segunda ordem (unidades de $M^{-1} \text{ min}^{-1}$). Os dados foram analisados utilizando a suposição de pseudo-primeira ordem, onde a concentração de um reagente (C5 neste caso) é mantida em vasto excesso sobre a outra ($[C5] \gg [ARC186]$), e conseqüentemente permanece essencialmente inalterada durante o curso da reação. Nestas condições, a reação é descrita através da equação da taxa para um processo de primeira ordem, $v_{for} = k_1'[C5][ARC 186]$, onde $k_1' = k_1[C5]$.

Para analisar a dissociação de C5-ARC186, ARC186 radioetiquetado ($\leq 10 \mu\text{M}$) foi pré-equilibrado com 5 nM de proteína C5 em solução salina tamponada de fosfato contendo 1 mM de $MgCl_2$ em temperatura ambiente (23 °C). A reação de dissociação foi iniciada através da adição de ARC186 não etiquetado (1 μM), que atua como uma armadilha para C5 livre, e interrompida através de filtração com particionamento com nitrocelulose do ARC186 radioetiquetado livre e ligado. Foi obtido um curso de tempo de dissociação de ARC186 variando a duração entre a iniciação da reação de dissociação e filtração. O tempo de curso da dissociação, observado como uma diminuição na percentagem de ARC186 radioetiquetado capturado no filtro de nitrocelulose (igual

à percentagem ligada a C5), é bem descrito através de um declínio exponencial único onde % de ARC186 ligado = $100 \times e^{-k^{-1}t}$ (veja-se Figura 11). O valor da constante da taxa de dissociação, k_{-1} , determinado através deste método é $0,013 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$, correspondendo a uma semivida ($t_{1/2} = \ln 2 / k_{-1}$) de $53 \pm 8 \text{ min}$.

Para analisar a reação de associação, a constante da taxa de equilíbrio (k_{eq}) para a formação de C5·ARC186 foi medida na presença de concentrações variadas de proteína C5 (1 - 5 nM). A formação do complexo foi iniciada misturando proteína C5 e ARC186 radioetiquetado em PBS contendo 1 mM de MgCl_2 à temperatura ambiente (23 °C), e interrompida através de filtração com particionamento em nitrocelulose. Conforme descrito para as reações de dissociação, foi obtido um curso de tempo de formação de complexo variando a duração entre a iniciação da reação e filtração. O curso de tempo do equilíbrio, observado como um aumento na percentagem de ARC186 radioetiquetado capturado no filtro de nitrocelulose, é bem descrito através de um declínio exponencial único onde % de ARC186 ligado = $100 \times (1 - e^{-k_{eq}t})$. Os cursos de tempo de equilíbrio para 1, 2 e 4 nM de C5 são apresentados na Figura 12. Conforme esperado, o valor de k_{eq} aumenta linearmente com [C5] (k_{eq} (1 nM) = $0,19 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$; k_{eq} (2 nM) = $0,39 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$; k_{eq} (3 nM) = $0,59 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$; k_{eq} (4 nM) = $0,77 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$; k_{eq} (5 nM) = $0,88 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$). Nas condições da experiência, a relação entre k_{eq} , k_1 e k_{-1} é $k_{eq} = k_1[\text{C5}] + k_{-1}$. Consequentemente, uma estimativa de k_1 é derivada da inclinação de um gráfico de k_{eq} frente a [C5] (veja-se inserção da Figura 12), neste caso $0,18 \pm 0,01 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}$.

Estes dados indicam que, em condições de baixa concentração de C5 (por exemplo, 0,1 nM), é requerida uma incubação prolongada de maneira que a mistura de C5 e ARC186 radioetiquetado alcance o equilíbrio. Nestas condições, $k_{eq} = (0,18 \pm 0,01 \text{ nM}^{-1}\text{min}^{-1}) (0,1 \text{ nM}) + 0,013$

$\text{min}^{-1} = 0,03 \text{ min}^{-1}$, correspondendo a uma semivida de 22 min. Consequentemente, são necessárias quase 2 horas de incubação em temperatura ambiente (~ 5 semividas) para o equilíbrio completo (> 95 %). Um curto tempo de incubação (por exemplo, 15 min) subestimar \acute{a} significativamente a afinidade real do complexo, conforme apresentado acima atr \acute{a} s da diferen \acute{c} a nas afinidades observadas durante incubação de 15 min ($K_D = 0,5 \text{ nM}$) frente a 4 horas ($K_D = 0,08 \text{ nM}$). Pode ser calculada uma estimativa alternativa de K_D à temperatura ambiente a partir dos dados cinéticos de acordo com a relação $K_D = k_{-1}/k_1$. Neste caso, o K_D calculado é $0,07 \pm 0,01 \text{ nM}$, que é completamente consistente com o K_D determinado acima atr \acute{a} s de métodos termodinâmicos.

A especificidade de ARC186 (SEQ ID NO: 4) para C5 também foi avaliada nos ensaios de filtração com nitrocelulose atr \acute{a} s de comparaç \tilde{a} o com componente dos complementos tanto a montante como a jusante de C5 na cascata do complemento. Foram adquiridos prote \acute{i} nas e complexos de prote \acute{i} na humanas purificadas da Complement Technologies (Tyler, Tx) incluindo: C1q (cat. n. $^\circ$ A099.18; 2,3 μM), C3 (cat. n. $^\circ$ A113c.8; 27 μM), C5 (cat. n. $^\circ$ A120.14; 5,4 μM), C5a des Arg (cat. n. $^\circ$ A145.6; 60 μM), sC5b-9 (cat. n. $^\circ$ A127.6; 1 μM), fator B (cat. n. $^\circ$ A135.12; 11 μM) e fator H (cat. n. $^\circ$ A137.13P; 6,8 μM). Foram estabelecidas rea \tilde{c} o \tilde{e} s de ligaç \tilde{a} o atr \acute{a} s da realizaç \tilde{a} o de diluiç \tilde{a} o \tilde{e} s em s \acute{e} rie de prote \acute{i} na em PBS mais 1 nM de MgCl_2 0,02 mg/ml de BSA e 0,002 ng/ml de ARNt, incubando durante 1-4 horas a 25 $^\circ\text{C}$ ou 37 $^\circ\text{C}$, e ent \tilde{a} o aplicadas à filtraç \tilde{a} o com aparelho de nitrocelulose conforme descrito acima. As constantes de dissociaç \tilde{a} o K_D foram determinadas a partir de gr \acute{a} ficos de semi-log da % de ligaç \tilde{a} o de nitrocelulose frente a [C5] atr \acute{a} s de um ajuste dos dados para a equaç \tilde{a} o: % de ligaç \tilde{a} o de nitrocelulose = amplitude x [C5] / ($K_D + [C5]$).

Os resultados apresentados na Figura 13 mostram que o

aptâmero essencialmente não reconhece C5a ($K_D \gg 3 \mu\text{M}$), embora este apresente afinidade fraca para C5b-9 solúvel ($K_D > 0,2 \mu\text{M}$), presumivelmente devido às interações com o componente de C5b. Outros componentes do complemento apresentam afinidade moderada a fraca para o aptâmero. C3 essencialmente não ativado não liga ao aptâmero; contudo, o fator H ($K_D \sim 100 \text{ nM}$) e, com uma intensidade muito menor, Clq ($K_D > 0,3 \mu\text{M}$) realmente liga. Tomados juntos, os dados indicam que ARC186 (SEQ ID NO: 4) liga com alta afinidade ao C5 humano, principalmente por meio do reconhecimento do domínio C5b. Consequentemente, ARC186 e os seus derivados PEGuilados, por exemplo, ARC1905 não devem interferir com a geração de C3b, que é importante para a opsonização bacteriana, ou com controlo inato de ativação de C' por parte de fatores regulatórios.

A conjugação de aptâmeros com frações de PEG de elevada massa molecular introduz a possibilidade de impedimento estérico levando a menor afinidade. Os aptâmeros modificados por PEG não são prontamente avaliados para ligação direta através de ensaios de filtração com nitrocelulose devido à tendência destes aptâmeros aderirem à nitrocelulose inclusive na ausência de proteína alvo. Contudo, as afinidades relativas destes aptâmeros podem ser estimadas a partir da sua capacidade comparativa de competir com aptâmero radioetiquetado, não PEGuilado ($\leq 10 \text{ pM}$) para ligação ao alvo, conforme medido através de filtração com nitrocelulose conhecida como um ensaio de ligação de competição, feita correr a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. A medida em que a concentração de competidor frio (isto é, não etiquetado) aumenta, a percentagem de aptâmero radioetiquetado ligado à proteína alvo diminui. Conforme apresentado na Figura 14, concentrações crescentes de ARC186 frio (SEQ ID NO: 4) ou aptâmero PEGuilado (ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62), e ARC187 (SEQ ID NO: 5) ($0,05 - 1000 \text{ nM}$) competem prontamente com ARC186

radioetiquetado (SEQ ID NO: 4) pela ligação na presença de 2 nM de proteína C5. Adicionalmente, as curvas de titulação para os quatro aptâmeros quase se sobrepõem, indicando que a conjugação a PEG no caso de ARC657, ARC658 e ARC187 tem pouco ou nenhum efeito na afinidade do aptâmero para C5.

Num estudo semelhante, o efeito de conjugação de PEG na ligação a C5 foi testado comparando ARC672 (ARC186 com uma amina 5'-terminal; SEQ ID NO: 63) com ARC1905 (ARC627 conjugado com um (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo) PEG) ramificado de 40 kDa utilizando o ensaio de ligação de competição. Foram preparados soluções-mãe de 10 μ M de cada aptâmero em PBS mais 1 mM de $MgCl_2$, 0,01 mg/ml de BSA, 0,002 mg/ml de ARNt, e diluídos em série para gerar uma série de amostra de 10X cobrindo um intervalo de concentração >100 vezes de aptâmero. Foram então adicionados 12 μ L de alíquotas de cada amostra numa placa de 96 poços a 96 μ L de ARC186 radioetiquetado com ^{32}P para gerar uma solução 1,1X de competidor etiquetado e não etiquetado. 90 μ L de solução de etiqueta/competidor foram então adicionados a 10 μ L de 10X proteína C5 para iniciar as reações. A concentração final de ARC186 radioetiquetado em cada reação foi mantida constante. As reações de ligação foram equilibradas durante 15 - 30 min a 37 °C, e então filtradas em equipamento de filtro de nitrocelulose descrito acima. Para os propósitos de análise de dados, os aptâmeros competidores não etiquetados foram tratados como inibidores competitivos da interação ARC186/C5; % de inibição foi calculada normalizando os dados para controlar reações carecendo de competidor (0 % de controlo de inibição). Os valores de CI_{50} foram determinados a partir de gráficos semi-log de % de inibição frente a [ARC672] ou [ARC1905] por um ajuste dos dados para a equação: % de inibição = amplitude X $[competidor]^n / (CI_{50}^n + [competidor]^n)$.

Conforme apresentado na Figura 60, a adição de um PEG

ramificado de 40 kDa (2,3- bis(mPEG-[20 kDa])- propil-1-carbamilo) teve pouco ou nenhum efeito na afinidade do aptâmero conforme medido através de ligação competitiva. Os valores K_D de 0,46 +/- 0,149 nM e 0,31 +/- 0,130 nM foram aproximados para ARC672 e ARC 1905, respetivamente através da interceção y do ajuste de linha para CI_{50} em função dos dados de C5 na Figura 60. Ambos os valores são próximos a K_D determinado para ARC186 a 37 °C.

A dependência da temperatura da interação entre ARC1905 e C5 também foi estimada através de ensaio de competição. ARC 1905 foi diluído em série para gerar séries de amostra de 10X tal como descrito acima. Reações de ligação foram equilibradas durante 1- 4 horas a 25 °C ou 37 °C, e então filtradas no equipamento de filtro de nitrocelulose. A percentagem de inibição foi calculada normalizando os dados para controlar reações carecendo de competidor (0 % de controlo de inibição) ou carecendo de proteína C5 (100 % de controlo de inibição). Os valores de CI_{50} foram determinados a partir de gráficos semi-log de % de inibição frente a [ARC672] ou [ARC1905] através de um ajuste dos dados para a equação: % de inibição = amplitude X $[competidor]^n / (CI_{50}^n + [competidor]^n)$. Conforme apresentado na Figura 61, ARC1905 liga a C5 com alta afinidade tanto a 25 °C como a 37 °C. Os valores de K_D de 0,15 ± 0,046 nM e 0,69 ± 0,148 nM foram obtidos a 25 °C e 37 °C, respetivamente, da interceção y do CI_{50} em função dos dados de C5. Ambos os valores são consistentes com os valores de K_D determinados para a interação ARC186/C5 descrita acima.

Exemplo 1B: Ensaio de Sangue Inteiro.

O efeito do aptâmero anti-C5 sobre a via alternativa do sistema complemento foi analisado utilizando o seguinte ensaio de sangue inteiro. Na ausência de um anticoagulante, foi extraído sangue a partir de voluntários humanos normais. Alíquotas de sangue (não contendo anticoagulante)

foram incubadas com concentrações crescentes de ARC186 (SEQ ID NO: 4) durante 5 horas à temperatura ambiente ou 37 °C. As amostras foram centrifugadas para isolar soro e a presença de C5b no soro foi detetada através de ELISA de sC5b-9 (C5b-9 ELISA kit, Quidel, San Diego, CA). Tal como apresentada na Figura 15, a atividade anti-complemento, refletida na produção de C5b-9, entre amostras incubadas a diferentes temperaturas divergiu em 3 µM. Os dados de temperatura ambiente indicaram que a concentração de aptâmero necessária para a inibição quantitativa se encontra no intervalo de 3-6 µM, enquanto a concentração relatada de C5 é aproximadamente 400 nM. Os resultados sugerem que pode ser requerido mais que 10 vezes de excesso molar de aptâmero anti-C5 (ARC186; SEQ II) NO: 4) para inibição completa da atividade de C5.

Exemplo 1C: Ativação do complemento através de zimosano

O zimosano é um componente polissacarídeo da parede celular de leveduras e um potente ativador da cascata alternativa do complemento. A adição de zimosano a amostras *ex vivo* de sangue, plasma ou soro resulta na acumulação da ativação dos produtos do complemento, incluindo C5a e a versão solúvel de C5b-9 (sC5b-9). Amostras de soro humano não diluído (Center for Blood Research, Boston, MA), sangue inteiro humano com citrato (Center for Sangue Research, Boston, MA) ou soro de cinomolgo (Charles River Labs, Wilmington, MA) foram inoculados com concentrações crescentes de ARC658 (SEQ ID NO: 62), o análogo de PEG 30KDa de ARC186 (SEQ ID NO: 4). Para ativar o complemento, foi adicionado zimosano (Sigma, St. Louis, MO) numa suspensão 10X às amostras até uma concentração final de 5 mg/ml. Após 15 minutos de incubação a 37 °C, as partículas de zimosano foram removidas através de centrifugação através de ELISA de C5a e/ou sC5b-9 (C5b-9 ELISA kit, Quidel, San Diego, CA; C5a ELISA kit, BD Biosciences, San Diego, CA).

Na ausência de aptâmero, o tratamento com zimosano ativa ~50 % de C5 do soro ou sangue inteiro, comparado com ~1 % de ativação na amostra não tratada. A adição de aptâmero anti-C5 até 50 nM (~10 % de concentração de C5 no sangue) teve pouco efeito na formação de sC5b-9. Contudo, titulação adicional de C5 com concentrações crescentes de ARC658 (SEQ ID NO: 62) inibiu a ativação de C5 de uma maneira dependente da dose, conforme visto na Figura 16. No soro ou sangue inteiro humano, a inibição quantitativa (~99 %) foi observada a 0,8 - 1 µM de ARC658 (SEQ ID NO: 62), correspondendo a ~2 equivalentes molares de aptâmero para C5. Foram necessárias maiores concentrações de aptâmero para alcançar inibição comparável no soro de cinomolgo. Neste caso, foi alcançada 99 % de inibição somente na presença de 10 µM de aptâmero, ou ~20 equivalentes molares de aptâmero para C5.

Num estudo semelhante, os efeitos inibidores de C1905 (a versão ramificada peguilada de ARC186 de 40 kDa (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo)) foram testados em amostras de humano e macaco cinomolgo utilizando o zimosano para ativar o complemento por meio da via alternativa, conforme segue. Zimosano A partir de *Saccharomyces cerevisiae* foi proporcionado pela Sigma-Aldrich, Inc. (n° de cat. Z4250-1G, St. Louis, MO). O zimosano A foi proporcionado na forma de um pó e foi ressuspensado em PBS de Dulbecco (Gibco, Carlsbad, CA, cat. n° 14190-144) para produzir uma suspensão de 50 mg/ml. Foi adquirido soro humano normal congelado, agrupado (n° de cat. IPLA-SER) da Innovative Research (Southfield, W. Frozen, soro de macaco cinomolgo agrupado (n° de cat. CYN SRM) foi adquirido da Bioreclamation (Hicksville, NY). Frascos de 5 -10 ml de soro proporcionados pelo fornecedor foram descongelados a 37 °C, aliqüotados (-1 ml) e armazenados a - 20 °C. Aliqüotas foram descongeladas conforme necessário imediatamente antes da utilização por meio de incubação a

37 °C e armazenadas em gelo durante as experiências. A concentração final de soro em cada ensaio foi ~100 %. Uma solução-mãe de 20 µM de ARC1905 foi preparada em 0,9 % de solução salina e diluída em série para gerar uma série de amostras 10X cobrindo um intervalo de concentração de ~90 vezes de aptâmero. Uma amostra sem aptâmero (solução salina somente) também foi incluída como um controlo negativo (0 % de inibição).

90 µL de soro foram pipetados em poços de uma placa de PCR de 96 poços (VWR, cat. n° 1442-9596). 10 µL de amostra de aptâmero foram diluídos diretamente no soro à temperatura ambiente e misturados. 8 µL de 50 mg/ml de zimosano foram pipetados em poços de uma placa de PCR de 96 poços separada. Ambas placas foram simultaneamente pré-incubadas a 37 °C durante 15 minutos. Imediatamente após pré-incubação, 80 µL da mistura soro/aptâmero foram adicionados a 8 µL de zimosano e misturados, rendendo 8 mg/ml de zimosano de concentração final. A placa de reação foi selada e incubada durante 15 minutos a 37 °C. No final da incubação, a reação foi extinta pipetando 8 µL de EDTA a 0,5 M nos poços e misturando. O zimosano foi precipitado através de centrifugação (3.700 rpm, temperatura ambiente) e ~80 µL de sobrenadante extinto foi transferido para uma placa de PCR de 96 poços nova e selado. Os sobrenadantes foram congelados frescos em azoto líquido e armazenados a -20 °C. Para controlar a ativação de fundo independente de zimosano, foram preparadas amostras de soro e tratadas exatamente conforme descrito acima, exceto que foram adicionados 8 µL de solução salina em vez de zimosano.

A extensão da ativação de C5 foi determinada a partir dos níveis relativos de C5a gerados em cada amostra ativada por zimosano, conforme medido através de ELISA de C5a (ALPCO Diagnostics, Windham, NH, cat. n.º. EIA-3327) seguindo o protocolo do *kit* de ELISA de C5a. O *kit* de ELISA de C5a inclui reagentes específicos humanos e encontra-se

formatado para análise de C5a humano (hC5a) em amostras de plasma ou soro. Desta forma, foi necessário caracterizar a resposta de ELISA para C5a de macaco cinomolgo utilizando padrões de concentração de cinomolgo. Para preparar um conjunto de padrões personalizados, alíquotas de 0,5 ml de soro de humano e de macaco cinomolgo foram incubadas com 5 mg/ml de zimosano durante 15 min a 37 °C, extintas com 12,5 µL de 0,5 M de EDTA e centrifugadas para remover o zimosano. A concentração de C5a na amostra de soro humano ativado por zimosano foi determinada como sendo aproximadamente 2 µg/ml de hC5a através de comparação com plasmas padrão de hC5a proporcionados com o *kit*. A concentração de C5a na amostra de macaco cinomolgo, expressa em equivalentes de C5a de humano (hC5a eq), foi determinada como sendo aproximadamente 0,6 pg/ml de hC5a eq. Séries de padrões cobrindo um intervalo de 0,4 - 400 ng/ml de hC5a ou 0,12 - 120 ng/ml de hC5a eq foram preparadas através de diluição em soro de rato (que não interfere com ELISA). Os padrões foram pré-tratados com um reagente precipitador de proteína conforme indicado no protocolo do *kit* ELISA e aplicados sem diluição adicional à placa de ELISA. A placa de ELISA foi lida a uma absorvância máxima de 450 nm (A₄₅₀) utilizando um leitor de placa de absorvância VersaMax UV/vis (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). A A₄₅₀ variou com a concentração de C5a desde um valor inferior de 0,1 - 0,2 a C5a baixo, mostrando patamar a ~3,5 a C5a alto. Para os propósitos de quantificar C5a em amostras de ensaio, os limites superior e inferior da quantificação foram, respectivamente, 25 e 0,78 ng/ml de hC5a para humano e 15 e 0,94 ng/ml de hC5a eq para macaco cinomolgo. A₄₅₀ frente a ng/ml de hC5a ou hC5a eq foi disposto em gráfico conforme apresentado na Figura 62, e foi obtida uma curva padrão a partir de um ajuste de quatro parâmetros para os dados utilizando a equação $y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D$.

Imediatamente antes da análise de C5a, amostras de ensaio (incluindo os controlos de somente solução salina e sem zimosano) foram pré-tratadas com reagente precipitador de proteína conforme indicado no protocolo do *kit* ELISA, posteriormente diluídas em série em solução salina a 0,9 %. Os níveis de C5a em amostras de ensaio não diluídas (incluindo alguns dos controlos sem zimosano) excederam tipicamente o limite superior de quantificação (ULOQ). Desta forma, foram testadas diluições de 1/5, 1/50 e 1/250 para acomodar o intervalo completo das concentrações de amostras de ensaio de C5a. Os níveis de C5a foram quantificados através de comparação com a curva padrão adequada (humano ou macaco cinomolgo) e corrigidos para diluição. A % de inibição em cada concentração de aptâmero foi calculada utilizando a equação % de inib. = 100 - 100 X $(C5a_{amostra} - C5a_{sem\ zimosano}) / (C5a_{solução\ salina\ somente} - C5a_{sem\ zimosano})$. Os valores de CI_{50} foram determinados a partir de um gráfico de % de inibição frente a [ARC 1905] utilizando a equação % de inib. = (% de inib.)_{máxima} X [ARC1905]ⁿ / ($CI_{50}^n + (ARC1905)^n$) + fundo. Os valores de CI_{90} e CI_{99} foram calculados a partir de valores de CI_{50} utilizando as equações $CI_{90} = CI_{50} \times [90/(100-90)]^{1/n}$ e $CI_{99} = CI_{50} \times [99/(100-99)]^{1/n}$.

A extensão da ativação de C3 (a etapa na via do complemento comum imediatamente a montante de C5) foi determinada a partir dos níveis relativos de C3a gerado em cada amostra ativada por zimosano, conforme medido através de ELISA de C3a (Becton Dickinson OptiEIA C3a ELISA *kit*, cat. n.º. 550499, Frandklin Lakes, NJ) seguindo o protocolo do *kit* ELISA de C3a.

Imediatamente antes da análise de C3a, as amostras (incluindo os controlos de somente solução salina e sem zimosano) foram diluídas em série em solução salina a 0,9 %. O ELISA de C3a é mais sensível que para C5a; desta forma, foram necessárias diluições de 1/500, 1/5000 e

1/25.000 para acomodar o intervalo completo de concentração na amostra de C3a. Foram utilizados padrões de *kit*, derivados a partir de soro humano, em vez dos padrões personalizados preparados para análise de C5a. Uma vez que os níveis de C3a não variaram grandemente, os padrões específicos de humano proporcionaram uma indicação suficiente dos seus níveis relativos.

Os dados gerados a partir de ELISAs tanto de C5a como de C3 foram analisados utilizando Microsoft Excel, e os valores médios de % de inibição foram dispostos em gráfico utilizando Kaleidagraph (v. 3.51, Synergy Software). Os valores de CI_{50} , CI_{90} e CI_{99} foram determinados utilizando o *plug-in* XLfit 4.1 para Excel. Os efeitos comparativos de ARC1905 na ativação do complemento humano e de macaco cinomolgo, conforme medido através desta abordagem, são resumidos na Figura 63 e Figura 64. Conforme pode ser visto a partir destas figuras, a inibição completa da ativação de C5 por meio da via alternativa é alcançada *in vitro* com ARC 1905 tanto em soros humanos como de macacos cinomolgos. No soro humano, a concentração de ARC 1905 necessária para 90 % de inibição da ativação de C5 numa amostra não diluída foi 442 ± 23 nM, aproximadamente equivalente à concentração molar média de C5. Contudo, ARC1905 foi 4 - 6 vezes menos potente contra a atividade do complemento de macaco cinomolgo sob as condições do ensaio, conforme refletido nos valores de CI_{90} e CI_{99} .

Os efeitos da ativação de C3 por parte de ARC1905, medidos através dos níveis de C3a, são resumidos na Figura 65. A razão para visar especificamente o terminal da via do complemento é bloquear as funções pró-inflamatórias de C5a e do complexo de ataque à membrana (MAC) sem comprometer as funções de luta contra o agente patogénico por parte dos fatores a montante culminando na geração de C3a e C3b. Os dados na Figura 65 demonstram que ARC1905, até 2 μ M, não inibe a geração de C3a e indicam que a ativação a montante

do complemento não é impactada negativamente por parte de ARC1905. O bloqueio essencialmente completo da via alternativa de ativação de C5 foi alcançado em amostras de soro tanto de humano como de macaco cinomolgo utilizando ARC1905. ARC1905 foi aproximadamente uma ordem de magnitude menos potente na inibição da ativação de C5 de macaco cinomolgo que da ativação de C5 humano nas condições deste ensaio. Enquanto não pretendendo ficar limitado pela teoria, o efeito inibidor de ARC1905 na ativação do complemento é específico para C5, uma vez que a ativação de C3 não foi inibida.

Exemplo 1D: Modelo de ansa de tubo de ativação do complemento

Para testar a capacidade do aptâmero anti-C5 de bloquear a ativação do complemento induzida através de exposição a materiais estranhos, conforme constatado num circuito de *bypass* cardiopulmonar, foi utilizado o modelo de ansa de tubo descrito por Nilsson e colaboradores (Gong *et al.*, (1996) *Journal of Clinical Immunology* 16, 222-9; Nilsson *et al.*, (1998) *Blood* 92, 1661-7). Tubo médico/cirúrgico Tygon 5-50 HL (1/4" de diâmetro interno) (United States Plastic Corp. ((Lima, OH), cat. n.º 00542) foi cortado em comprimentos de aproximadamente 300 mm (aproximadamente 9 ml de volume) e preenchido com 5 ml de sangue de dador humano contendo 0,4 unidades/ml de heparina (Celsus) e concentrações variadas de C658 (SEQ ID NO: 62) (0-5 µM). Cada comprimento de tubo Tygon foi fechado num ansa com secções curtas (~50 mm) de tubo ligando de silicone não cirúrgico (3/8" de diâmetro interno) (United States Plastic Corp. (formulação R-3603, cat. n.º 00271) tal como descrito em Gong *et al.* Ansas de tubo foram giradas durante 1 hora a aproximadamente 30 rpm num banho de água de 37 °C. Os conteúdos da ansa foram então vertidos em tubos cónicos de polipropileno contendo EDTA (10 mM de concentração final) para extinguir a ativação do

complemento. Foi isolado plasma pobre em plaquetas através de centrifugação e analisado para C5a e C3a através de ELISA (C3a ELISA Quidel, San Diego, CA; C5a ELISA kit, BD Biosciences, San Diego, CA).

A ativação total do complemento na ausência de aptâmero foi pequena em comparação com o ensaio com zimosano. Tipicamente, níveis de C5a aumentaram em aproximadamente 6 ng/ml Após 1 hora de incubação, correspondendo à ativação de <1 % do C5 disponível. Contudo, este aumento foi reproduzível e inibido por titulação com ARC658 (SEQ ID NO: 62). Conforme apresentado na Figura 17, 300 - 400 nM de ARC658 (SEQ ID NO; 62) foram suficientes para alcançar 99 % de inibição da ativação de C5, um nível que é aproximadamente equivalente ou ligeiramente menor do que a concentração molar de C5 no sangue. Embora não pretendendo ficar limitado pela teoria, embora seja requerido menos aptâmero para obter 99 % de inibição de ativação de C5 neste modelo do que no modelo de zimosano, esta observação poderia refletir as diferenças substanciais no estímulo de ativação do complemento utilizado nos dois ensaios. A geração de C3a também foi monitorizada como um controle para verificar que ARC658 (SEQ ID NO: 62) não bloqueou as etapas de ativação antes de C5 na cascata do complemento. Os níveis de C3a aumentaram em aproximadamente 4000 ng/ml Após 1 hora de incubação, correspondendo à ativação de cerca de 10 % do C3 disponível. Ao contrário da geração de C5a, pouca inibição dependente da dose da geração de C3a foi observada após titulação com ARC658 (SEQ ID NO: 62) demonstrando que ARC658 (SEQ ID NO: 62) bloqueia especificamente a clivagem de C5.

O estudo do modelo de ansa de tubo foi repetido com o aptâmero anti-C5 ARC1905 (SEQ ID NO: 67). ARC1905 foi diluído em série em solução salina a 0,9 % para gerar uma série de amostra 20X cobrindo um intervalo de concentrações

de aptâmero de 100 vezes (10 - 1000 nM final no ensaio). Foram incluídas amostras contendo aptâmero irrelevante (ARC127) para controlar os efeitos de oligonucleótido não específico. Uma amostra sem aptâmero (somente solução salina) também foi incluída como um controlo negativo. Amostras de sangue de dador único foram extraídas através de métodos de flebotomia padrão a partir de voluntários internos. Foi extraído sangue inteiro a partir de 5 dadores separados diretamente numa seringa de 60 ml (Becton-Dickinson, (Franklin Lakes, NJ), cat. n.º 309653) e imediatamente aliquoteados em bivalirudina (20 µM final) (Prospec-Tarry Technogene Ltd., (Israel), lote n.º 105BIV01) +/- aptâmero. O anticoagulante bivalirudina, um inibidor direto de trombina, foi utilizado em vez de heparina que interfere na ativação do complemento.

O modelo de ansa de tubo foi realizado essencialmente conforme descrito imediatamente acima. Secções de ~ 300 mm de tubo (diâmetro de 1/4", volume de ~9 ml) foram preenchidas com 5 ml de amostras de sangue/aptâmero/bivalirudina imediatamente após o sangue ter sido extraído a partir do dador. Os tubos foram então seguramente fechados em ansas com secções curtas (~50 mm) de tubo ligando de silicone, rendendo um volume de gás de 4 ml. As ansas de tubo foram giradas verticalmente a 32 rpm durante incubação num banho de água a 37 °C durante 1 hora. Após incubação, todos os 5 ml da amostra foram transferidos para um tubo cónico de 15 ml (Corning, (Coring, NY), cat. n.º 430766) contendo 100 µL de EDTA a 0,5 M, dando uma concentração final de EDTA de 10 mM. Foi recolhido 1 ml de sobrenadante de plasma a partir de cada amostra finalizada após centrifugação (Centrífuga Eppendorf 5804) a 4 °C (3.300 rpm, 20 minutos). Os sobrenadantes foram congelados frescos em azoto líquido e armazenados a - 20 °C. Para controlar a ativação de fundo, uma amostra pré-CPB foi preparada adicionando 5 ml de sangue fresco diretamente a

um tubo cónico de 15 ml em gelo contendo 100 µL de EDTA a 0,5 M. Esta amostra foi processada para o plasma e armazenada conforme descrito acima.

A extensão da ativação de C5 foi determinada a partir dos níveis relativos de C5a gerados em cada amostra ativada, conforme medido através de ELISA de C5a conforme descrito imediatamente acima. O ELISA C5a foi realizado em amostras de plasma não diluídas de acordo com o protocolo do kit de ELISA e os níveis de C5a na amostra foram quantificados através de comparação com os padrões de C5a proporcionados pelo fabricante. A % de inibição de geração de C5a em cada concentração de aptâmero foi calculada utilizando a equação % de inib. = $100 - 100 \times (C5a_{amostra} - C5a_{pré-CPB}) / (C5a_{solução\ salina\ somente} - C5a_{pré-CPB})$. Os valores CI_{50} foram determinados a partir de um gráfico de % de inibição frente a [ARC1905] utilizando a equação % de inib. = $(\% \text{ de inib.})_{máxima} \times [ARC\ 1905]^n / (CI_{50}^n + [ARC1905]^n) + \text{fundo}$. Os valores de CI_{90} e CI_{99} foram calculados a partir dos valores de CI_{50} utilizando as equações $CI_{90} = CI_{50} \times [90/(100-90)]^{1/n}$ e $CI_{99} = CI_{50} \times [99/(100-99)]^{1/n}$.

A extensão da ativação de C3 foi determinada a partir dos níveis relativos de C3a gerados em cada amostra ativada, medida por ELISA de C3a conforme descrito imediatamente acima. Imediatamente antes da análise de C3a, foram diluídas amostras (incluindo os controlos de somente solução salina e pré-CPB) em série em solução salina a 0,9 %. O ELISA de C3a é mais sensível do que para C5a; desta forma, foi necessária uma diluição de 1/5000 para acomodar o intervalo de concentrações de C3a na amostra. Os níveis de C3a na amostra foram quantificados através de comparação dos padrões do kit, e a % de inibição foi calculada conforme descrito para C5a. Os dados foram analisados utilizando Microsoft Excel, e os valores de % de inibição média foram dispostos em gráfico utilizando Kaleidagraph (Software v3.5 Synergy). Os valores de CI_{50} , CI_{90} e CI_{99}

foram determinados utilizando o *plug-in* XLfit 4.1 para Excel.

Os efeitos médios de ARC1905 e aptâmero irrelevante, ARC127, sobre a ativação do complemento nos cinco dadores são resumidos na Figura 66. Conforme apresentado na Figura 67 o bloqueio completo da ativação de C5, conforme refletido na geração de C5a, foi alcançado com <500 nM de ARC1905, enquanto o aptâmero irrelevante não teve qualquer efeito inibidor até 1 μ M. Os valores de CI_{50} , CI_{90} e CI_{99} médios do sangue inteiro foram $119 \pm 28,6$ nM, $268 \pm 39,2$ nM e 694 ± 241 nM, respetivamente (Figura 66). Embora não pretendendo ficar limitado pela teoria, é razoável assumir que ARC1905 é excluído a partir do volume de sangue celular, que compreende aproximadamente 45 % do total. Os valores de CI_{50} , CI_{90} e CI_{99} , ajustados para refletir inibição de C5 no plasma, desta forma, foram $216 \pm 52,0$ nM, 487 ± 71 nM e 1261 ± 438 nM. Estes valores são consistentes com os parâmetros calculados para inibição de ARC1905 de ativação do complemento induzida por zimosano em soro sugerindo que os componentes celulares do sangue não interferem significativamente na atividade anti-C5 de ARC1905. A geração de C3a não foi inibida por parte de ARC1905 ou aptâmero irrelevante até 1 μ M. Embora não pretendendo ficar limitado pela teoria, isto sugere que ARC1905 não inibe a reação de convertase de C3, nem bloqueia outras etapas que contribuem para a ativação da cascata alternativa, tais como deposição de C3 e montagem da convertase.

EXEMPLO 2

Seleções e Sequências De Novo

Seleção de C5 com conjunto dRmY

Foram realizadas duas seleções para identificar aptâmeros dRmY para proteína C5 de comprimento completo humana. A proteína C5 (Quidel Corporation, San Diego, CA ou Advanced Research Technologies, San Diego, CA) foi

utilizada na forma de comprimento total ("FL") e parcialmente tripsinizada ("TP") e ambas seleções foram seleções diretas contra as proteínas alvo que foram imobilizadas numa placa hidrofóbica. Ambas seleções produziram conjuntos significativamente enriquecidos para ligação a C5 de comprimento completo frente a conjunto não exposto, não selecionado. Todas as sequências mostradas neste exemplo são mostradas de 5' para 3'.

Preparação do conjunto: Um molde de ADN com a sequência

TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTACN₍₃₀₎GGTCGATCGATCG ATCATCGATG (ARC520; SEQ ID NO: 70) foi sintetizado utilizando um sintetizador de ADN ABI EXPEDITE™ e desprotegido através de métodos padrão. Os moldes foram amplificados com iniciador 5' TAATACGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC (SEQ ID NO: 71) e iniciador 3' CATCGATGATCGATCGATCGACC (SEQ ID NO: 72) e posteriormente utilizados como um molde para transcrição *in vitro* com ARN polimerase T7 mutante única de Y639F. Foram feitas transcrições utilizando de HEPES a 200 mM, de DTT a 40 mM, de espermidina a 2 mM, de TritonX-100 a 0,01 %, de PEG-8000 a 10 %, de MgCl₂ a 9,5 mM, de MgCl₂ a 2,9 mM, de NTPs a 2 mM, de GMP a 2 mM, de espermina a 2 mM, 0,01 unidades/μl de fosfatase inorgânica, e polimerase mutante única de T7 Y639F.

Seleção: Na ronda 1, foi conduzida uma etapa de seleção positiva nas colunas de ligação do filtro de nitrocelulose. Brevemente, 1×10^{15} moléculas (0,5 nmol) de ARN do conjunto foram incubadas em 100 μL de tampão de ligação (1 X DPBS) com 3 uM de C5 de comprimento completo ou 2,6 uM de C5 parcialmente tripsinizada durante 1 hora à temperatura ambiente. Os complexos ARN:proteína e moléculas de ARN livre foram separados utilizando 0,45 um de colunas de rotação de nitrocelulose da Schleicher & Schnell (Keene, NH). As colunas foram pré-lavadas com 1 ml de 1X DPBS, e posteriormente as soluções contendo ARN:proteína foram

adicionadas às colunas e giradas numa centrífuga a 1500 g durante 2 minutos. Foram realizadas três lavagens de tampão de 1 ml para remover aglutinantes não específicos a partir dos filtros, posteriormente os complexos de ARN:proteína unidos aos filtros foram eluídos duas vezes com lavagens de 200 µl de tampão de eluição (ureia a 7 M, acetato de sódio a 100 mM, EDTA a 3 mM, pré-aquecido a 95 °C). O ARN eluído foi precipitado (2 µl glicogénio, 1 volume de isopropanol, ½ volume de etanol). O ARN foi submetido a transcrição reversa com o sistema ThermoScript RT-PCR™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o iniciador 3' descrito acima SEQ ID NO: 72, seguido por amplificação por PCR (Tris a 20 mM pH 8,4, KCl a 50 mM, MgCl₂ a 2 mM, iniciadores SEQ ID NO: 71 e SEQ ID NO: 72 a 0,5 µM, cada dNTP a 0,5 mM, 0,05 unidades/µl de polimerase Taq (New England Biolabs, Beverly, MA)). Os moldes de PCR foram purificados utilizando colunas Centrincep (Princeton Separations, Princeton, NJ) e utilizados para transcrever o seguinte conjunto de ronda.

Nas rondas subsequentes de seleção, a separação do ARN ligado e livre foi feita em placas hidrofóbicas Nunc Maxisorp (Nunc, Rochester, NY). A ronda foi iniciada imobilizando 20 pmol de C5 tanto de comprimento total como parcialmente tripsinizada na superfície da placa durante 1 hora à temperatura ambiente em 100 µl de 1X DPBS. O sobrenadante foi então removido e os poços foram lavados 4 vezes com 120 µl de tampão de lavagem (1X DPBS). Os poços de proteína foram então bloqueados com um tampão de 1X DPBS contendo 0,1 mg/ml de ARNt de levedura e 0,1 mg/ml de ADN de esperma de salmão como competidores. A concentração do conjunto utilizada foi sempre pelo menos em excesso de cinco vezes da concentração da proteína. O ARN do conjunto também foi incubado durante 1 hora à temperatura ambiente em poços vazios para remover quaisquer sequências de ligação plástica, e então incubado num poço bloqueado sem

qualquer proteína para remover quaisquer sequências de ligação competidoras a partir do conjunto antes da etapa de seleção positiva. O ARN do conjunto foi então incubado durante 1 hora à temperatura ambiente e o ARN ligado ao C5 imobilizado foi submetido a transcrição reversa diretamente na placa de seleção através de adição de mistura de RT (iniciador 3', SEQ ID NO:72 e Thermoscript RT, Invitrogen) seguido por incubação a 65 °C durante 1 hora. O ADNc resultante foi utilizado como um molde para PCR (polimerase Taq, New England Biolabs). ADN de molde de conjunto amplificado foi dessalgado com uma coluna Centrisep (Princeton Separations) de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante e utilizado para programar a transcrição do ARN do conjunto para a seguinte ronda de seleção. O conjunto transcrito foi purificado em gel num gel de 10 % de poliacrilamida a cada ronda.

O progresso da seleção foi monitorizado utilizando um ensaio de ligação de filtro de sanduíche (*dot blot*). O ARN do conjunto etiquetado com 5'-³²P (concentração vestigial) foi incubado com C5, 1X DPBS mais 0,1 mg/ml de ARNt e 0,1 mg/ml de ADN de esperma de salmão, durante 30 minutos à temperatura ambiente, e então aplicado a um filtro de sanduíche de *nylon* e nitrocelulose e num aparelho de *dot blot* (Schleicher e Schuell). A percentagem de ARN de conjunto ligado à nitrocelulose foi calculada e monitorizada aproximadamente a cada 3 rondas com um ecrã de ponto único (+/-300 nM de C5). As medições de K_D do conjunto foram medidas utilizando uma titulação de proteína e o aparelho de *dot blot* conforme descrito acima.

Dados de seleção 10 rondas sobre o conjunto não exposto. Veja-se Figura 18. Na ronda 10, o K_D do conjunto foi aproximadamente 115 nM para a seleção de comprimento total e 150 nM para a tripsinizada, mas a extensão da ligação foi somente cerca de 10 % no patamar em ambas. Os conjuntos de R10 foram clonados utilizando *kit* de clonagem

TOPO TA (Invitrogen) e sequenciados.

Informação da sequência: Foram sequenciados 45 clones a partir de cada conjunto. O conjunto de comprimento completo de R10 foi dominado por um único clone ARC913 (SEQ ID NO: 75) que constituiu 24 % do conjunto, 2 conjuntos de duplicados e sequências únicas constituíram o restante. O conjunto tripsinizado de R10 conteve 8 cópias da mesma sequência ARC913 (SEQ ID NO: 75), mas o conjunto foi dominado por outra sequência (AMX221.A7; 46 %). O clone ARC913 (SEQ ID NO: 75) teve um K_D de cerca de 140 nM e a extensão da ligação foi para 20 %. Veja-se Figura 19.

A sequência individual listada no Quadro 3 é listada na direção 5' para 3' e representa a sequência de ribonucleótidos do aptâmero que foi selecionada sob as condições SELEX™ de dRmY proporcionadas. Nas formas de realização da invenção derivadas a partir desta seleção (e refletidas na lista de sequências) as purinas (A e G) são desoxi e as pirimidinas (U e C) são 2'-OMe. A sequência listada no Quadro 3 pode ou não conter *capping* (por exemplo, um dT 3'-invertido). A sequência única do aptâmero a seguir começa no nucleótido 23, imediatamente após a sequência fixa GGGAGAGGAGAGAACGWCUCAC (SEQ ID NO: 73), e prolonga-se até que alcançar a sequência de ácidos nucleicos fixa 3' GGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG (SEQ ID NO: 74)

Quadro 3: Sequência de nucleótidos do aptâmero dRmY de C5

ARC913 (SEQ ID NO: 75)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUCGCAGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

Ensaio de hemólise: O efeito de ARC913 (SEQ ID NO: 75) sobre a via clássica do sistema complemento foi analisado utilizando um ensaio de hemólise previamente descrito, em comparação tanto com ARC186 (SEQ ID NO: 4) (aptâmero anti-C5, controlo positivo) como com conjunto de dRmY não selecionado (controlo negativo). No ensaio de inibição

hemolítica; uma solução de soro total humano a 0,2 % foi misturada com eritrócitos de ovelha revestidos com anticorpo (Diamedix Ez Complement CH50 Test, Diamedix Corporation, Miami, FL) na presença de ARC913 titulado (SEQ ID NO: 75). O ensaio foi realizado em solução salina tamponada com veronal contendo cálcio, magnésio e gelatina a 1 % (tampão complemento GVB⁺⁺) e incubado durante 1 hora a 25 °C. Após incubação as amostras foram centrifugadas. A densidade ótica a 415 nm (OD₄₁₅) do sobrenadante foi lida. A inibição da atividade de hemólise é expressa como % da atividade de hemólise comparada com o controlo. Veja-se Figura 20. O CI₅₀ do aptâmero foi calculado como sendo cerca de 30 nM.

EXEMPLO 3

Otimização da Composição e Sequência

Exemplo 3A: Minimização de ARC913:

Seis construções com base em ARC913 (SEQ ID NO: 75) foram transcritas, purificadas em gel, e testadas em *dot blots* para ligação a C5. ARC954 foi semelhante ao clone parental com um K_d de 130 nM e extensão de ligação a 20 %, enquanto ARC874 (SEQ ID NO: 76) foi o único outro clone que ligou a C5 com um K_d de 1 uM.

As sequências individuais listadas no Quadro 4 são listadas na direção de 5' para 3' e foram derivadas a partir de aptâmeros que foram selecionados sob as condições SELEX[™] de dRmY proporcionadas. Nas formas de realização da invenção derivadas a partir desta seleção (e refletidas na lista de sequências) as purinas (A e G) são desoxi e as pirimidinas (U e C) são 2'-OMe. Cada uma das sequências listadas no Quadro 4 pode ou não conter *capping* (por exemplo, um dT 3-invertido).

Quadro 4. Sequências de nucleótidos de clones minimizados de ARC913

ARC874 (SEQ ID NO: 76)

CCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUAACGCAGGG

ARC875 (SEQ ID NO: 77)

CCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAAACGCAGGG

ARC876 (SEQ ID NO: 78)

GGGUUUGGCACAGGCAUACAUACCC

ARC877 (SEQ ID NO: 79)

GGGUUUGGCACAGGCAUACAAACCC

ARC878 (SEQ ID NO: 80)

GGCGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGCC

ARC954 (SEQ ID NO: 81)

CGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGAUCC

Exemplo 3B: Otimização de ARC913: Re-seleção dopada

De maneira tanto a otimizar o clone ARC913 (SEQ ID NO: 75) para afinidade de ligação a C5 como a determinar os elementos de ligação chave, foi conduzida uma re-seleção dopada. As re-seleções dopadas são utilizadas para explorar os requisitos da sequência num clone ou minímero ativo. As seleções são realizadas com um conjunto sintético, degenerado que foi desenhado com base numa única sequência. O nível de degeneração normalmente varia de 70 % a 85 % de nucleótido tipo selvagem. Em geral, mutações neutras são observadas, mas Nalguns casos as alterações na sequência podem resultar em melhorias na afinidade. A informação de sequência compósita pode então ser utilizada para identificar o motivo de ligação mínimo e auxiliar nos esforços de otimização.

Preparação do conjunto: A sequência molde taatacgactcactataGGGAGAGGAGAGAACGTTCTACN₍₃₀₎GTTACGACTAGCATCG ATG (SEQ ID NO: 82) foi baseada em ARC913 (SEQ ID NO: 75) e foi sintetizada com cada resíduo originando a partir da região aleatória dopada a um nível de 15 %, isto é, em cada posição ("N") aleatória, o resíduo teve uma possibilidade de 85 % de ser o nucleótido encontrado na sequência CTTGTTTGGCACAGGCATACATACGCAGGGGTCGATCG (SEQ ID NO: 83) tipo selvagem e uma possibilidade de 15 % de ser um de

outros três nucleótidos.

O molde e conjunto de ARN para a re-seleção dopada foram preparados essencialmente conforme descrito acima. Os moldes foram amplificados com os iniciadores taatacgactcactataGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC (SEQ ID NO: 84) e CATCGATGCTAGTCGTAAC (SEQ ID NO: 85). Foram feitas duas seleções com C5 de comprimento completo, uma seleção utilizando uma concentração maior de sal na etapa de lavagem. O protocolo de seleção foi realizado conforme descrito acima, com duas exceções: 1) A ronda 1 foi feita em placas hidrofóbicas (bem como todas as rondas subsequentes) com somente uma etapa positiva; e 2) não foi utilizado qualquer competidor de modo algum durante a seleção. A concentração de C5 e concentração do conjunto de ARN foram mantidas constantes a 200 nM e 1 uM respectivamente.

Dados de re-seleções dopadas. Tanto as seleções normais como ricas em sal foram enriquecidas após 5 rondas sobre o conjunto não exposto. Na ronda 5 o K_d do conjunto foi aproximadamente 165 nM para a seleção rica em sal e 175 nM para a seleção de sal normal. A extensão da ligação foi cerca de 20 % no patamar em ambas. Os conjuntos R4 foram clonados utilizando kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA), e foram sequenciados 48 clones de cada conjunto. Foram transcritos 12 clones a partir de cada conjunto e ensaiados num ensaio *dot blot* de ponto único a 500 nM de C5. As constantes de dissociação (K_{ds}) foram novamente medidas utilizando o ensaio *dot blot* previamente descrito. As K_{ds} foram estimados para os 11 melhores clones identificados na seleção de ponto único, por meio do ajuste dos dados para a equação: fração de ARN ligado = $\text{amplitude} \cdot K_d / (K_d + [C5])$. Os clones com os três melhores K_{ds} foram SEQ ID NO: 91 (73 nM), SEQ ID NO: 96 (84 nM) e SEQ ID NO: 95 (92 nM). As sequências para estes 11 clones são listadas a seguir no Quadro 5.

As sequências listadas no Quadro 5 são listadas na direção de 5' para 3' e representam a sequência de nucleótidos dos aptâmeros que foram selecionados sob as condições de SELEX™ de dRmY proporcionadas. Nas formas de realização da invenção derivadas a partir desta seleção (e conforme refletido na lista de sequências), as sequências correspondentes compreendendo as combinações de resíduos dRmY, conforme indicado no texto, em que as purinas (A e G) são desoxi e as pirimidinas (U e G) são 2'-OMe. Cada uma das sequências listadas no Quadro 5 podem ou não conter *capping* (por exemplo, um dT 3'-invertido). As sequências únicas de cada um dos aptâmeros abaixo começam no nucleótido 23, imediatamente após a sequência fixa GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC (SEQ ID NO: 86), e prolonga-se até que alcançar a sequência fixa de ácidos nucleicos 3' GUUACGACUAGCAUCGAUG (SEQ ID NO: 87).

Quadro 5. Sequências de nucleótidos de clones a partir de re-seleção dopada

(SEQ ID NO: 88)
GGGAGGGAGAGAACCGUUCUACCGUUGGCACAGGCACAGGCAUACAUACGAGGGGUCGGAUCGGUJAGGACUAGCAUJCGGAUG

(SEQ ID NO: 89)
GGGAGGGAGAGAACCGUUCUACCGUUGGCACAGGCAUACAUACGAGGUGUCGSAUCUGUJAGGACUAGCAUJCGGAUG

(SEQ ID NO: 90)
GGGAGGGAGAGAACCGUUCUACCGUUGGCACAGGCAUACAUACGAGGUCGCAUACGAGGUCGSAUCUGUJAGGACUAGCAUJCGGAUG

(SEQ ID NO: 91)
GGGAGGGAGAGAACCGUUCUACCGUUGGCACAGGCAUACAUACGAGGUCGCAUACGAGGUCGSAUCUGUJAGGACUAGCAUJCGGAUG

(SEQ ID NO: 92)
GGGAGGGAGAGAACCGUUCUACCGUUGGCACAGGCAUACAUACGAGGUCGCAUACGAGGUCGSAUCUGUJAGGACUAGCAUJCGGAUG

(SEQ ID NO: 93)
GGGAGGGAGAGAACCGUUCUACCGUUGGCACAGGCAUACAUACGAGGUCGCAUACGAGGUCGSAUCUGUJAGGACUAGCAUJCGGAUG

(SEQ ID NO: 94)
GGGAGGGAGAGAACCGUUCUACCGUUGGCACAGGCAUACAUACGAGGUCGCAUACGAGGUCGSAUCUGUJAGGACUAGCAUJCGGAUG

(SEQ ID NO: 95)
GGGAGGGAGAGAACCGUUCUACCGUUGGCACAGGCAUACAUACGAGGUCGCAUACGAGGUCGSAUCUGUJAGGACUAGCAUJCGGAUG

(SEQ ID NO: 96)
GGGAGGGAGAGAACCGUUCUACCGUUGGCACAGGCAUACAUACGAGGUCGCAUACGAGGUCGSAUCUGUJAGGACUAGCAUJCGGAUG

(SEQ ID NO: 97)
GGGAGGGAGAGAACCGUUCUACCGUUGGCACAGGCAUACAUACGAGGUCGCAUACGAGGUCGSAUCUGUJAGGACUAGCAUJCGGAUG

(SEQ ID NO: 98)
GGGAGGGAGAGAACCGUUCUACCGUUGGCACAGGCAUACAUACGAGGUCGCAUACGAGGUCGSAUCUGUJAGGACUAGCAUJCGGAUG

Exemplo 3C: Modificação de PEG Ramificado de 40 kDa de ARC186

O oligonucleótido 5' NH₂-fCmGEXGMmGmGfUfCftTfCmAmGmG GfCfUmGmAmGfGfmCmAmGfUfUfUfUAfCfUmGfCmG-3' (ARC672, SEQ ID NO: 63) foi sintetizado num sintetizador de ADN Expedite (ABI, Foster City, CA) de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante utilizando ARN 2'-OMe e ARN 2'-F e fosforamidites de ARN protegidas por TBDMS padrão comercialmente disponíveis (Glen Research; Sterling, VA) e um suporte de CPG de desoxitimidina invertido. A função amina terminal foi unida a um modificador 5-amino, 6-(trifluoracetilamino)hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidite, C6-TFA (Glen Research, Sterling, VA). Após desproteção, os oligonucleótidos foram purificados através de cromatografia de permuta iónica em resina Super Q 5PW (30) (Tosoh Biosciences) e etanol precipitou.

O aptâmero modificado por amida foi conjugado a diferentes frações de PEG pós-sinteticamente. O aptâmero foi dissolvido numa solução água/DMSO (1:1) até uma concentração entre 1,5 e 3 mM. Foi adicionado tampão de carbonato de sódio, pH 8,5, a uma concentração final de 100 mM, e o oligo foi feito reagir durante a noite com um excesso molar de 1,7 do reagente PEG desejado (por exemplo, ARC1905 de 40 kDa Sunbright GL2-400NP éster de carbonato de p-nitrofenilo [NOF Corp, Japão], ou ARC187 de 40 kDa mPEG2 NHS éster [Nektar, Huntsville AL]) dissolvido num volume igual de acetonitrilo. Os produtos resultantes foram purificados através de cromatografia de permuta iónica em resina Super Q 5PW (30) (Tosoh Biosciences), e dessalgados utilizando cromatografia de fase reversa realizada em resina Amberchrom CG300-S (Rohm e Haas), e liofilizados. A estrutura de ARC187 (SEQ ID NO: 5) é mostrada na Figura 21, enquanto a estrutura de ARC1905 (SEQ ID NO: 67) é mostrada na Figura 22.

EXEMPLO 4**Modelo de Coração Perfundido Isolado**Exemplo 4A: Prova de princípio com ARC186

A concentração média do componente do complemento C5 no plasma humano é aproximadamente 500 nM. Após exposição de corações de ratinho isolados perfundidos com tampão Krebs Heinseleit para plasma humano a 6 %, a cascata do complemento humano é ativada, levando à clivagem de C5 em C5a e C5b. O componente C5b forma subsequentemente um complexo com componente dos complementos C6, C7, C8 e C9 também conhecidos como o "complexo de ataque à membrana" ("MAC" ou C5b-9) que provoca dano nos vasos sanguíneos do coração e miócitos cardíacos, levando consequentemente à disfunção do miocárdio (maior pressão diastólica final, arritmias) e assistolia (Evans *et al.*, Molecular Immunology, 32, 1183-1195 (1995)). Previamente, os anticorpos de cadeia monoclonal e simples que bloqueiam a clivagem de C5 humano (Pexelizumab ou uma versão scFv de cadeia simples de Pexelizumab) foram testados neste modelo e mostrados como inibindo o dano e disfunção do miocárdio (Evans *et al.*, 1995).

Este modelo foi utilizado para estabelecer que o aptâmero ARC186 que bloqueia C5 (SEQ ID NO: 4), como Pexeluzimab, inibiu a lesão ao complemento mediada por C5 humana a corações de ratinho perfundidos isolados. Ratinhos C57 B1/6 foram adquiridos da Charles River Laboratories, (Wilmington, MA). Com brevidade, após indução de anestesia profunda, o coração de cada ratinho foi removido e fixado numa agulha romba inserida na aorta, por meio da qual o coração foi continuamente perfundido com tampão de Krebs Heinseleit. Um transdutor de pressão (Mouse Specifics, Boston, MA) foi inserido no ventrículo esquerdo permitindo medição contínua da taxa cardíaca e pressão intraventricular. Após um período de 15 minutos de equilíbrio durante os quais foram feitas medições da linha

de base, os corações foram subsequentemente perfundidos com tampão e plasma humano a 6 % +/- aptâmero a várias concentrações (Veja-se Figura 23). Durante estes estudos e conforme descrito em Evans *et al.*, foi demonstrado que os corações que foram perfundidos com tampão de Krebs Heinseleit + plasma humano a 6 % falharam 5 minutos após a adição do plasma ao perfundido, enquanto os corações que foram continuamente perfundidos somente com tampão continuaram a bater durante mais de duas horas. Desta forma, o tamanho de cada experiência foi arbitrariamente definido como 15 minutos. O esquema deste estudo com ARC186 é apresentado na Figura 23.

A pressão intraventricular foi monitorizada e registrada continuamente resultando num traçado de onda de pressão (Figuras 24 e 25). O menor ponto de deflexão representa a pressão diastólica final ("EDP") e o maior ponto de deflexão representa a pressão sistólica ("SP"). Ondas de pressão na linha de base aparecem à esquerda da linha preta vertical marcada "0" mostrada em cada traçado. Conforme previamente publicado (Evans *et al.*, 1995), os corações perfundidos com plasma a 6 % humano experimentaram um rápido aumento na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, finalmente culminando na assistolia (o coração para) em 5 minutos (Figura 24). Quando foi adicionado aptâmero irrelevante ao plasma humano num excesso molar de 50 vezes, foram observadas EDP aumentada e assistolia (Figura 24).

Quando foi adicionado ARC186 ao sistema em equivalência molar, também houve um aumento precipitado da EDP, culminando em assistolia (Figura 25). Nos três conjuntos de corações que experimentaram dano mediado pelo complemento, EDP aumentada e assistolia, o coração estava visivelmente edematoso e túrgido ao final da experiência. Quando foi adicionado ARC186 ao plasma em excesso molar de 10 vezes ou 50 vezes (Figura 25), as ondas de pressão

ventricular permaneceram normal e não foi observada assistolia. Além disso, o edema e turgidez previamente descritos não foram aparentes nestes grupos.

Durante cada experiência, a taxa cardíaca foi registada em intervalos de 5 minutos e a taxa cardíaca média para o grupo durante cada intervalo foi disposta em gráfico. Conforme apresentado na Figura 26, os corações perfundidos sem aptâmero ou com aptâmero irrelevante desenvolveram assistolia rapidamente, normalmente em 5 minutos. ARC186 adicionado ao sistema em equivalência molar atrasou ligeiramente o início da assistolia. Os corações neste grupo finalmente falharam, contudo. ARC186 adicionado ao plasma em excesso molar de 10 vezes ou 50 vezes conservou a taxa cardíaca para a duração de cada experiência.

A percentagem de aumento da massa do coração sobre a linha de base foi calculada para uma amostra representativa de corações que falharam (sem aptâmero ou excesso molar de 50 vezes de aptâmero irrelevante) e comparada com corações protegidos com ARC186 (excesso molar de 10 vezes e 50 vezes de ARC186). Conforme mostrado na Figura 27, os corações protegidos com ARC186 ganharam significativamente menos massa que os corações que falharam nos grupos de controlo.

Devido a ARC186 inibir C5, mas não a clivagem de C3, produtos de clivagem de C3 (C3a), mas não produtos de clivagem de C5 (C5a ou C5b) devem ser encontrados no efluente fluindo a partir dos corações isolados protegidos por ARC186. Para mostrar diretamente que C186 inibiu a clivagem de C5 no plasma humano, os níveis relativos de proteínas do complemento C5a e C5b humano (produtos de clivagem de C5) e C3a (um produto de clivagem de C3) foram medidos no efluente de tampão de vários grupos através de kits de ELISA comercialmente disponíveis (*kit* ELISA C5b-9, Quidel, San Diego, CA; *kit* ELISA C5a e C3a, BD Biosciences, San Diego, CA). ARC186 inibiu a clivagem de C5 no plasma

humano e a produção de C5a (Figura 28) e C5b-9 (Figura 29) de uma maneira dependente da dose. Em contraste, ARC186 não teve qualquer efeito na clivagem de C3 humano em C3a e C3b (Figura 30) demonstrando adicionalmente a especificidade para C5 da molécula.

Uma vez gerados, os fragmentos C3b e C5b do complemento são depositados localmente nos tecidos na proximidade do sítio de ativação do complemento. Após a conclusão das experiências, os corações de ratinhos foram congelados em meio OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA), seccionados e posteriormente corados utilizando imunohistoquímica padrão para a presença de C3b humano (clone H11, Chemicon, Temecula, CA), C5b-9 humano (clone aE11, DAKO, Carpinteria, CA) ou IgG de ratinho controle (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Resultados do estudo são apresentados na Figura 31.

Conforme descrito neste estudo, o aptâmero ARC186 que bloqueia C5 foi testado num modelo *ex vivo* de dano de tecido mediado por componente do complemento C5 que utiliza corações de ratinho isolados perfundidos com tampão de Krebs Heinseleit e plasma humano heparinizado a 6 %, com base num modelo descrito num estudo previamente publicado que testou os efeitos do anticorpo anti-C5, Pexelizumab no sistema do complemento (Evans, *Molecular Immunol* 32:1183, (1995)). Utilizando este modelo, foi demonstrado que o aptâmero que bloqueia C5 (a) inibiu a clivagem de C5 no plasma humano (mas não de C3), (b) inibiu a deposição de C5b humano (mas não de C3b) em tecido cardíaco de ratinhos e (c) inibiu a disfunção miocárdica mediada por C5b-9 humano em concentrações clinicamente relevantes (5 μ M, um excesso molar de 10 vezes de aptâmero vs. C5). Estes dados mostram que quando a cascata do complemento humano é ativada de uma maneira fisiologicamente relevante, os aptâmeros que bloqueiam C5 são capazes de inibir a clivagem de C5 plasmático e prevenir dano e disfunção do miocárdio.

Exemplo 4B: Eficácia do aptâmero PEGuilado

O material e métodos utilizados neste estudo foram exatamente os mesmos que os descritos no Exemplo 4A acima. O desenho experimental e resultados são apresentados na Figura 32. A primeira metade da experiência utilizou plasma heparinizado humano (Center for Blood Research, Harvard Medical School, Boston, MA) como uma fonte de complemento e a segunda metade utilizou plasma de macaco cinomolgo heparinizado (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) como uma fonte de complemento. Um aptâmero PEGuilado (ARC658; SEQ ID NO:62) foi adicionado ao sistema em razões molares crescentes. Embora todos os sinais de pressão ventricular relevantes tenham sido recolhidos, o quadro lista a presença ou ausência de um aumento na pressão diastólica final (EDP), tenha a assistolia ocorrido ou não e o tempo até a falha do coração (definido como a presença de EDP elevada e assistolia).

Durante as experiências com plasma humano, a dose ideal de 658 (SEQ ID NO: 62) foi determinada como sendo de equivalência molar (500 uM), enquanto durante as experiências com plasma de primata não humano, um excesso molar de 50 vezes (25 µM) tenha sido necessário para proteger o coração do dano mediado por C5b (veja-se Figura 32).

Estes dados são consistentes com a diferença na afinidade do aptâmero anti-C5 para C5 humano frente a primata não humano indicados através dos dados *in vitro*. Embora não pretendendo ficar limitado pela teoria, durante os estudos subsequentes com PK/PD de macaco cinomolgo descritos no Exemplo 5, foi adicionalmente demonstrado que um excesso molar de 30 vezes de aptâmero foi necessário para inibir a clivagem de C5 no plasma mediada por zimosano, suportando adicionalmente a noção que o aptâmero liga ao C5 de primata com menor afinidade do que C5 humano.

Coletivamente, estes estudos indicam que tanto

aptâmeros ARC186 que bloqueiam C5 (SEQ ID NO: 4) como a uma maior extensão ARC658 (SEQ ID NO: 62) são eficazes no modelo de coração isolado, perfundido de ratinhos. Este modelo também demonstrou que teve que ser utilizado significativamente mais ARC658 (SEQ ID NO: 62) para inibir dano cardíaco mediado por C5 de plasma de macaco cinomolgo (excesso molar de 30+ vezes), em comparação com dano cardíaco mediado por C5 humano (equivalência molar), suportando adicionalmente dados *in vitro* que indicaram que o aptâmero teve menor afinidade para C5 de primata. Finalmente, estes dados indicaram que macacos cinomolgos necessitariam ser doseados para além de um excesso molar de 30 vezes de forma a demonstrar o bloqueio de C5 *in vivo* durante estudos de PK/PD.

EXEMPLO 5

METABOLISMO DE FÁRMACO & FARMACOCINÉTICA DE APTÂMEROS ANTI-C5 EM ANIMAIS

Nos Exemplos 5A-5G, todos os dados de concentração baseados na massa referem-se somente à massa molecular da porção do aptâmero do oligonucleótido, independente da massa conferida pela conjugação do PEG.

Exemplo 5A: Estabilidade metabólica do ARC186 inibidor de C5 em plasma de primata e rato

O precursor de oligonucleótido não PEGuilado dos aptâmeros (isto é, ARC 186; SEQ ID NO: 4) foi testado em plasma de rato e macaco cinomolgo (Charles River Labs, Wilmington, MA) de forma a estimar a sua estabilidade, cinética de taxa e vias de degradação. O teste foi realizado utilizando aptâmero radioetiquetado (³²P) no terminal 5' incubado a 37° C em de plasma agrupado a 95 % (citratado) durante o curso de 50 horas. Em pontos de tempo selecionados, foram extraídas alíquotas de plasma contendo aptâmero, imediatamente congeladas frescas em azoto líquido, e armazenadas a -80° C. A deteção e análise do aptâmero e dos seus metabolitos no plasma foi realizada

utilizando extração líquido-líquido (fenol-clorofórmio) seguida por eletroforese em gel (num de gel de sequenciamento de poliacrilamida de desnaturação a 10 %) e autorradiografia de alta resolução.

A Figura 33 mostra um gráfico log-linear da percentagem restante de aptâmero de cadeia completa como uma função de tempo de incubação em plasma tanto de rato como de macaco cinomolgo. O perfil de degradação em ambas as espécies parece ser essencialmente monofásico, com uma taxa constante de aproximadamente $k \sim 0,002 \text{ h}^{-1}$.

Exemplo 5B: Farmacocinética de AR657, ARC658 e ARC187 em rato após administração intravenosa

Para estimar o perfil farmacocinético de ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) e ARC187 (SEQ ID NO: 5), e para estimar o nível de dosagem e frequência necessários em primatas e humanos, foi conduzido um estudo farmacocinético em ratos Sprague-Dawley cateterizados (Charles River Labs, Wilmington, MA). Os aptâmeros foram formulados para injeção a 10 mg/ml (massa de oligo) em solução salina padrão e filtrados (0,2 μm) num frasco de dosagem pré-esterilizado em condições assépticas. A via de administração utilizada para o estudo em ratos foi um bólus intravenoso através da cauda a uma dosagem de 10 mg/kg. Os ramos do estudo consistiram em 3 animais por grupo, a partir dos quais foram realizadas exsanguinações em série pré-dosagem e em pontos de tempo especificados durante o curso de 48 horas. O desenho do estudo encontra-se delineado na Figura 34. Foram obtidas amostras de sangue a partir dos cateteres da veia jugular cirurgicamente implantados, transferidas diretamente para os tubos revestidos com EDTA, misturadas através de inversão e colocadas em gelo até ao processamento do plasma.

O plasma foi recolhido através de centrifugação de tubos de sangue-EDTA a 5000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante (plasma) foi transferido para um tubo pré-

etiquetado fresco. Foram armazenadas amostras de plasma a - 80° C até ao momento da análise. A análise de amostras de plasma para ARC187 foi realizada utilizando um formato de ensaio homogêneo utilizando a adição direta de alíquotas de plasma para ensaiar poços contendo o reagente de detecção de ácido nucleico fluorescente comercialmente disponível Oligreen™ (Molecular Probes, Eugene, OR). Após um rápido período de incubação (5 min) à temperatura ambiente, protegidas da luz, as placas do ensaio foram lidas através de um leitor de placa por fluorescência (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). O sinal fluorescente a partir de cada poço foi proporcional à concentração de aptâmero no poço e as concentrações da amostra foram calculadas através de interpolação dos valores de fluorescência a partir de uma curva padrão fluorescência-concentração (valores médios de curvas em duplicado ou triplicado). Foram obtidas concentrações em plasma médias em cada ponto de tempo a partir dos três animais em cada grupo. Os dados de concentrações em plasmas frente a tempo foram submetidos a análise não compartimental (NCA) utilizando o *software* de modelamento farmacocinético padrão na indústria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Foram obtidas estimativas para os seguintes parâmetros farmacocinéticos primários: concentração em plasma máxima, C_{max} ; área sob a curva concentração-tempo, AUC; semivida terminal, $t_{1/2}$; depuração terminal, CI; e volume de distribuição em estado estável, V_{ss} .

São mostrados dados de concentração em plasma média em função do tempo na Figura 35 e são dispostos em gráfico na Figura 36. Os dados de concentração em função do tempo foram submetidos a análise não compartimental (NCA) utilizando WinNoLin™ v.4.0. Esta análise teve como resultado os valores apresentados na Figura 37.

Conforme previsto, o aptâmero ARC187 de 40 kDa (SEQ ID NO: 5) teve a maior semivida e o aptâmero ARC657 de 20 kDa

(SEQ ID NO: 61), a menor. O V_{ss} observado em relação ao volume plasmático conhecido (~40 ml/kg) sugeriu um grau moderado de ligação/sequestro de ARC187 (SEQ ID NO: 5) às proteínas e/ou matriz de tecido no espaço extravascular. Assumindo-se uma necessidade de manter um excesso molar de 5 vezes de aptâmero, os resultados deste estudo sugeriram que ARC187 (SEQ ID NO: 5) proporciona uma vantagem significativa em termos de frequência de dosagem e quantidade total de aptâmero necessário para manter os níveis plasmáticos desejados.

Estudos anteriores (dados não apresentados) em roedores e primatas com aptâmeros de composição semelhante mostraram proporcionalidade/linearidade de dosagem em doses até 30 mg/kg, então é previsto que este nível de dosagem resulte em conduta farmacocinética não linear.

Exemplo 5C: Farmacocinética de ARC187 e ARC1905 em ratinhos após administração intravenosa

Para avaliar o perfil farmacocinético da cadeia principal do oligonucleótido ARC186 (SEQ ID NO: 4) conjugado a um diferente PEG ramificado de 40 kDa do que o ARC187 (SEQ ID NO:5), foi conduzido um estudo farmacocinético em ratinhos CD-1 fêmeas (obtidos de Charles River Labs, Wilmington, MA). Foram formulados aptâmeros para injeção a 2,5 mg/ml (massa de oligo) em solução salina padrão e filtrados (0,2 μ m) num frasco de dosagem pré-esterilizado em condições assépticas. A via de administração utilizada para o estudo com ratinhos foi um bólus intravenoso através da veia caudal numa dose de 10 mg/kg. Os braços do estudo consistiram de 3 animais por grupo, a partir dos quais foram tomadas exsanguinações terminais pré-dose (isto é, o grupo de controlo não doseado) e em pontos de tempo especificados durante o curso de 72 horas. O desenho do estudo é delineado na Figura 38A.

As amostras de sangue foram obtidas através de punção cardíaca terminal, transferidas diretamente para tubos

revestidos com EDTA, misturadas através de inversão, e colocadas em gelo até ao processamento do plasma. Foi recolhido plasma através de centrifugação dos tubos sangue-EDTA a 5000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante (plasma) foi transferido para um tubo pré-etiquetado fresco. As amostras de plasma foram armazenadas a -80°C até a hora da análise. Foram realizadas análises de amostras de plasma para ARC187 e 1905 utilizando um formato de ensaio homogéneo utilizando a adição direta de alíquotas de plasma aos poços do ensaio contendo o reagente de deteção de ácido nucleico fluorescente comercialmente disponível Oligreen™ (Molecular Probes, Eugene, OU). Após um rápido período de incubação (5 min) à temperatura ambiente, protegidas da luz, as placas de ensaio foram lidas através de um leitor de placa por fluorescência (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). O sinal fluorescente de cada poço foi proporcional à concentração de aptâmero no poço e as concentrações da amostra foram calculadas através de interpolação de valores de fluorescência a partir de uma curva padrão de fluorescência-concentração (valores médios a partir de curvas em duplicado ou triplicado). As concentrações em plasmas médias foram obtidas em cada ponto de tempo a partir dos três animais em cada grupo. Os dados de concentração em plasma em função do tempo foram submetidos a análise não compartimental (NCA) utilizando o *software* de modelamento farmacocinético padrão da indústria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). Foram obtidas estimativas para os seguintes parâmetros farmacocinéticos primários: concentração em plasma máxima, C_{max} ; área sob a curva de concentração-tempo, AUC; semivida terminal, $t_{1/2}$; depuração terminal, Cl ; e volume de distribuição no estado estável, V_{ss} . Os dados de concentração em plasma média frente ao tempo são dispostos em gráfico na Figura 38B.

Os dados de concentração frente ao tempo foram

submetidos a análise não compartimental (NCA) utilizando WinNonLin™ v.4.0. Esta análise teve como resultado os valores apresentados na Figura 38C. Conforme previsto, os PEGS de 40 kDa de ambos vendedores apresentaram equivalência farmacocinética em ratinhos.

As mesmas amostras de plasma para ARC187 e 1905 utilizadas para análise oligreen descritas diretamente acima foram analisadas utilizando um ensaio de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) validado com detecção UV.

Os valores de concentração em plasma média para ARC187 e ARC1905 foram calculados utilizando 30 Microsoft Excel 2003. Quando os valores de concentração em plasma foram inferiores ao LLOQ do ensaio bioanalítico na pré-dose (tempo 0), foi designado um valor zero. Os valores por debaixo do LLOQ a partir das amostras tomadas pós-dose foram omissos do cálculo da concentração em plasma média. Os dados de concentração em plasma média foram utilizados numa análise PK independente do modelo utilizando WinNonlin, versão 5.1 (Pharsight Corporation, Mountainview, CA). A área sob a curva de concentração em plasma-tempo ($AUC_{0-\text{último}}$) foi estimada utilizando a regra trapezoidal linear. Para os cálculos, qualquer valor por debaixo de LLOQ do ensaio, exceto a amostra pré-dosagem, foi excluído dos cálculos para estimativas de parâmetros PK. A semivida terminal aparente foi calculada utilizando a fórmula $t_{1/2} = 0,693/\lambda_z$ onde λ_z é a taxa de eliminação constante estimada a partir da regressão da inclinação terminal da curva de concentração em função do tempo. Pelo menos três valores de concentração em plasma após concentração de pico na fase terminal foram utilizados para determinar λ_z e o coeficiente de determinação (r^2) foi requerido para ser $\geq 0,85$.

Em geral, a análise de HPLC confirma a análise oligreen descrita imediatamente acima mostrando que ARC1905

e ARC187 foram constatados como sendo bioequivalentes com base nas comparações das estimativas dos parâmetros de média C_{max} , $AUC_{0-último}$ e $AUC_{0-∞}$. Diferenças nos valores de $AUC_{0-último}$ e $AUC_{0-∞}$ para ARC1905 relativo a ARC187 (medidos por HPLC) encontravam-se dentro dos critérios de aceitabilidade de bioequivalência de $\pm 20 \%$.

Exemplo 5D: Estudo de absorção por parte do tecido dos inibidores de C5 ARC657, ARC658 e ARC187 em ratinhos após administração em bólus intravenoso

Foram obtidos ratinhos CD-1 fêmeas de Charles River Labs (Wilmington, MA). Formulações de ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) e ARC187 (SEQ ID NO: 5) para injeção foram em solução salina a 5 mg/ml. As formulações de dosagem foram filtradas (0,2 μ m) em frascos de dosagem pré-esterilizados sob condições assépticas e foi administrada aos animais um em bólus intravenoso através da veia caudal a uma dose de 25 mg/kg. O estudo consistiu em conjuntos de 3 animais para cada um dos quatro pontos de tempo, $t =$ pré-dosagem, 3, 6, 12 horas. Após a exsanguinação, a vasculatura de cada animal foi lavada extensivamente (V~30 ml) com solução salina para remover qualquer sangue restante na vasculatura. Os tecidos (coração, fígado, rins) foram recolhidos, pesados, posteriormente homogeneizados a 50 % p/v em solução salina padrão, e armazenados a -80° C até ao momento da análise.

A análise do tecido para ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62), e ARC187 (SEQ ID NO: 5) foi realizada utilizando um ensaio de tipo ELISA à base de hibridização. Neste ensaio, uma sonda de captura biotinilada foi pré-imobilizada nos poços de uma microplaca de 96 poços numa concentração de solução de ligação de 125 μ M durante 3 horas. Os poços da placa foram lavados 5 vezes com 1X PBS. As placas foram então bloqueadas com 150 μ l/poço de um 1X SuperBlock em TBS (Pierce Chemical, Rockford, IL). As placas foram lavadas novamente,

revestidas e armazenadas a 4° C até à utilização. Em tubos separados, a(s) amostra(s) foi(foram) hibridizada(s) num tampão contendo uma sonda de deteção de amostra etiquetada com FAM (5'-Fluoresceína) a 200 nM a 90 °C e posteriormente extinta(s) em gelo. Os padrões de concentração e amostras de controlo de plasma/tecido também foram pré-hibridizados com soluções de sonda de deteção de amostra e então pipetados em poços de placa de ensaio contendo sonda de captura de biotina imobilizada e hibridizados a 45° C durante 2,5 horas. As placas foram então lavadas novamente e preenchidas com 100 µl/poços de uma solução contendo 1X PBS contendo 1 µg/ml de anticorpo monoclonal anti-fluoresceína conjugado com peroxidase de rábano-silvestre (anti FITC MAb-HRP, Molecular Probes, Eugene, OR) em 1X PBS, e incubadas durante aproximadamente 1 hora. As placas foram lavadas novamente como acima. Os poços da placa de ensaio foram então preenchidos com 100 µl de uma solução contendo um substrato HRP fluorogénico (QuantaBlu, Pierce Chemical, Rockford, IL), e incubadas durante 20-30 min protegidas da luz. Após 45 minutos de incubação, foram adicionados 100 µl/poços de uma solução de paragem para extinguir a reação de produção de precipitado fluorescente. As placas foram lidas imediatamente num leitor de microplaca fluorescente (SpectraMax Gemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com excitação fluorescente a 325 nm e emissão detetada a 420 nm. Cada poço foi lido 10 vezes. Os três aptâmeros foram detetáveis no tecido do coração nos três pontos de tempo (Figura 39).

Exemplo 5E: Farmacocinética e Farmacodinâmica dos inibidores de C5 ARC657, ARC658 e ARC187 em macaco cinomolgo após administração intravenosa - estudo 1

A formulação de ARC657 (SEQ ID NO: 61), ARC658 (SEQ ID NO: 62) e ARC187 (SEQ ID NO: 5) para injeção foi em solução salina padrão a 10 mg/ml e as formulações de dosagem foram esterilizadas por filtração (0,2 µm) em frascos de dosagem

pré-esterilizados sob condições assépticas. A via de administração utilizada para o estudo em macaco foi um bólus intravenoso através de um cateter implantado cirurgicamente na veia femoral a uma dose de 30 mg/kg (aproximadamente excesso molar de 50 vezes). O desenho do estudo é delineado na Figura 40. Foram obtidas amostras de sangue a partir dos cateteres da veia femoral, transferidas diretamente para tubos revestidos com citrato de sódio, misturadas através de inversão, e colocadas em gelo até ser centrifugadas para separar plasma (3000 rpm durante 5 minutos). O plasma foi então dividido em alíquotas de 250 µl que foram armazenadas a -80° C e uma alíquota de cada amostra foi avaliada para a concentração de aptâmero utilizando o ensaio Oligreen™ com base em fluorescência previamente descrito na seção de PK de rato acima.

Os dados de concentração em plasma primária frente ao tempo são apresentados de forma tabular na Figura 41. Conforme previsto, o aptâmero ARC187 de PEG 40 kDa (SEQ ID NO: 5) persistiu no plasma durante o maior período de tempo, enquanto o aptâmero ARC657 de PEG 20 kDa (SEQ ID NO: 61) persistiu durante a menor quantidade de tempo. A inspeção dos dados mostrados na Figura 41 sugeriram que os dados seriam mais bem ajustados através de um modelo de dois compartimentos. Consequentemente, as estimativas do parâmetro farmacocinético relatadas na Figura 42 foram derivadas a partir do modelo de dois compartimentos utilizando o *software* de modelamento farmacocinético padrão da indústria WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

Conforme apresentado na Figura 42, todos os aptâmeros tiveram um valor de C_{max} semelhante, entre 23 e 30 µM, indicando que a dose de aptâmero (30 mg/kg) foi suficiente para alcançar um excesso molar de 50 vezes de aptâmero em plasma frente a concentração de C5 (excesso molar de 50 vezes, cerca de 25 µM). Embora sejam diferentes em massa

molecular 10.000, ARC657 (PEG de 20 kDa) (SEQ ID NO: 61) e ARC658 (PEG de 30 kDa) (SEQ ID NO: 62) tiveram valores de (AUC), $t_{1/2}(\alpha)$ e $t_{1/2}(\beta)$ de exposição semelhantes. Em contraste, ARC187 (SEQ ID NO: 5) tiveram valores de (AUC) de exposição significativamente maiores, um $t_{1/2}(\alpha)$ prolongado e um $t_{1/2}(\beta)$ ligeiramente maior que as outras moléculas.

Alíquotas adicionais das amostras de plasma recolhidas durante o estudo farmacocinético foram subsequentemente analisadas *in vitro* para determinar a eficácia do bloqueio de C5 de primata. O ensaio de ativação de zimosano foi realizado conforme descrito acima para determinar a quantidade de C5b-9 e C5a de primata gerado, respetivamente. Os dados foram dispostos em gráfico em vários formatos diferentes, incluindo concentração de amostra de C5b-9 frente ao tempo (Figura 43a), concentração de C5b-9 frente a concentração de aptâmero (Figura 43b), concentração de C5a frente a tempo da amostra (Figura 43c), e concentração de C5a frente a concentração do aptâmero (Figura 43d).

O aptâmero ARC187 de PEG de 40 kDa (SEQ ID NO: 5) inibiu a clivagem de C5 de primata (concentração de C5b-9 e C5a) durante o maior período de tempo (Figuras 43a e 43c). Quando os dados de C5b-9 e C5a foram dispostos em gráfico em função da concentração de aptâmero, indicaram que a concentração de aptâmero que bloqueia C5 teve que exceder o excesso molar de 30 vezes, independentemente do tamanho da molécula de PEG, de maneira que a clivagem de C5 seja completamente inibida (Figuras 43b e 43d).

Em resumo, os dados a partir do estudo PK/PD de macaco cinomolgo demonstram que (a) conforme previsto, foi necessário pelo menos um excesso molar de 30 vezes de aptâmero (cerca de 15 μ M de concentração em plasma de aptâmero) para inibir a clivagem de C5 *in vivo* em macaco cinomolgo, independentemente do tamanho do conjunto PEG,

(b) aptâmeros que bloqueiam C5 não causaram toxicidade premeditada nestas espécies, e (c) quando os animais foram doseados a um nível relativamente alto (excesso molar de 50 vezes), níveis de aptâmero plasmático encontravam-se no intervalo de ensaio adequado durante o período de amostragem para permitir o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos.

Exemplo 5F: Farmacocinética e farmacodinâmica dos inibidores de C5 ARC658 e ARC187 em macaco cinomolgo após administração intravenosa - estudo 2

O estudo 2 foi semelhante em desenho ao estudo 1 descrito acima, com as seguintes exceções a) somente foram avaliados dois compostos (ARC658 (SEQ ID NO: 62) e ARC187 (SEQ ID NO: 5); b) o número de animais foi aumentado para quatro por grupo; e c) a amostra em plasma de 1-minuto foi eliminada e substituída com uma amostra de 144 horas para garantir que a circulação da semivida terminal fosse baseada em mais pontos de dados. A formulação e dosagem destes dois aptâmeros, técnicas de amostragem de sangue e de isolamento de plasma foram idênticos aos métodos descritos acima no estudo 1. O desenho para o estudo é resumido na Figura 44.

Após completar o estudo 2, foram analisadas alíquotas de plasma conforme descrito no estudo 1 para determinar a) a concentração de aptâmero no plasma em vários pontos de tempo após administração intravenosa, e b) a eficácia do bloqueio de C5.

A concentração em plasma de aptâmero foi disposta em gráfico como uma função do tempo (Figura 45) e os dados primários para ARC658 (SEQ ID NO: 62) e ARC187 (SEQ ID NO: 5) são apresentados de forma tabular nas Figuras 39 e 40, respetivamente. O aptâmero ARC187 de PEG de 40 kDa (SEQ ID NO: 5) persistiu no plasma durante o maior período de tempo. A inspeção da Figura 45 indicou que os dados devem ser mais bem ajustados através de um modelo de dois

compartimentos. Conseqüentemente, as estimativas de parâmetro farmacocinético relatadas na Figura 46 foram derivadas a partir do modelo de dois compartimentos utilizando WinNonLin™ v.4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

Comparando os parâmetros farmacocinéticos gerados durante o estudo 1 e estudo 2 de PK/PD acima, os dados para ARC658 (SEQ ID NO: 62) e ARC187 (SEQ ID NO: 5) foram semelhantes com a exceção da medição de $t_{1/2}(\alpha)$ para ARC187. Embora não pretendendo ficar limitado pela teoria, a discrepância nas medições de $t_{1/2}(\alpha)$ para ARC187 entre os dois estudos é provavelmente devida ao pequeno tamanho da amostra no estudo piloto.

Conforme demonstrado na Figura 46, os valores de C_{max} foram semelhantes para ARC658 (SEQ ID NO: 62) e ARC187 (SEQ ID NO: 5). Em contraste, a exposição ao fármaco (AUC) foi significativamente maior em animais tratados com ARC187 (SEQ ID NO: 5). Também, ARC187 teve maiores valores $t_{1/2}(\alpha)$ e $t_{1/2}(\beta)$ em comparação com ARC658 (SEQ ID NO: 62). Estes dados, juntamente com os dados gerados durante o estudo 1 de PK/PD indicam que os aptâmeros ARC187 que bloqueiam C5 podem proporcionar o bloqueio mais eficaz *in vivo* C5 para uma dose dada.

As alíquotas adicionais das amostras de plasma recolhidas durante o estudo farmacocinético foram subsequentemente analisadas *in vitro* para determinar a eficácia do bloqueio de C5 de primata. Como antes, o ensaio de ativação de zimosano foi realizado para determinar a quantidade de C5b-9 e C5a primata, respectivamente, gerados. Os dados foram dispostos em gráfico como concentração de C5b-9 frente a concentração de aptâmero (Figura 47) e concentração de C5a frente a concentração de aptâmero (Figura 48). Conforme previamente demonstrado durante o estudo 1 de PK/PD, a concentração do aptâmero de bloqueio de C5 deve exceder um excesso molar de 30 vezes

(concentração de aptâmero para C5 em plasma), ou aproximadamente 15 μM , independentemente do tamanho da molécula de PEG, de maneira que a clivagem de C5 primata seja completamente inibida (Figuras 41 e 42).

Por meio da inspeção dos dados nos quadros das Figuras 39 e 40, percebe-se que após um bólus I.V. de 30 mg/kg, ARC658 (SEQ ID NO: 62) permanece por cima de 15 μM durante aproximadamente 4 horas, enquanto ARC187 permanece por cima de 15 μM por aproximadamente 8 horas. Consequentemente, dada uma dosagem semelhante de fármaco, o aptâmero ARC187 de 40 K proporciona eficácia clínica de aproximadamente duas vezes mais que o aptâmero ARC658 de 30K (SEQ ID NO: 62).

Em resumo, os macacos cinomolgos devem ser tratados com pelo menos um excesso molar de 30 vezes de aptâmero frente a C5 plasmático de maneira a bloquear a conversão de C5 *in vivo*. Estes dados são consistentes com estudos anteriores *in vitro* (hemólise) e *ex vivo* (coração de ratinho perfundido isolado) que sugeriram que os aptâmeros de ligação ao C5 tinham a uma menor afinidade para C5 primata frente a C5 humano. Foi mostrado que aptâmeros que bloqueiam C5 podem seguramente ser administrados como um bólus intravenoso numa dose de até 30 mg/kg, que equivale a aproximadamente um excesso molar de 50 vezes de concentração aptâmero frente a C5.

Exemplo 5G: ARC1905 no macaco cinomolgo após administração em bólus IV

A farmacodinâmica dos inibidores de C5 ARC1905 foi avaliada no macaco cinomolgo após administração intravenosa. A formulação de ARC1905 para injeção foi em solução salina padrão a 7,5 mg/ml e formulações de dosagem foram esterilizadas através de filtração (0,2 μm) em frascos de dosagem pré-esterilizados sob condições assépticas. Macacos cinomolgos (n=4) foram doseados a 0 (solução salina controlo) ou 30 mg/kg por meio de

administração em bólus intravenoso. Foram obtidas amostras de sangue a partir de uma veia periférica ou da porta de acesso arterial e foram transferidas amostras de sangue (0,5 ml) em tubos de EDTA dipotássico (K_2), colocadas em gelo húmido e centrifugadas em 30 minutos após a recolha a aproximadamente 4 °C.

As amostras de plasma foram analisadas *in vitro* para determinar a eficácia de ARC1905 sobre o bloqueio de C5 de primata. O ensaio de zimosano previamente descrito em relação ao ARC1905 no exemplo 1C foi utilizado para determinar a quantidade de C5a de primata gerado. A diminuição nos valores de C5a pós-zimosano em 0,5 e 2 horas após dosagem indica que ARC1905 inibe a clivagem de C5 *in vivo* no macaco cinomolgo de uma maneira semelhante ao ARC187 quando doseado aproximadamente à mesma concentração e através da mesma via de administração conforme medido *in vitro* utilizando o ensaio de ativação de zimosano.

Exemplo 5H: Farmacocinética e farmacodinâmica do ARC187 inibidor de C5 no macaco cinomolgo Após administração IV em bólus e infusão

Os perfis farmacocinéticos (PK) e farmacodinâmicos (PD) de ARC187 (SEQ ID NO: 5) também foram avaliados em macacos cinomolgos após um bólus de carga intravenosa seguido imediatamente pela iniciação de uma infusão intravenosa. Este desenho do estudo é mostrado na Figura 49.

A dosagem do bólus de carregamento e taxa de infusão necessária para alcançar a concentração em plasma de estado estável alvo de 1 uM foram calculadas utilizando os parâmetros farmacocinéticos derivados do estudo somente em bólus IV listado na Figura 50.

A um total de três macacos cinomolgos foi administrado um bólus IV de ARC187 a 1 mg/kg, seguido imediatamente pela iniciação de uma infusão IV a uma taxa de 0,0013 mg/kg/min durante um período de 48 horas. Foram recolhidas amostras

do sangue inteiro 0 a 192 horas pós-tratamento, armazenadas em gelo húmido, processadas para plasma, e então armazenadas congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A concentração de ARC187 nas amostras de plasma foi determinada utilizando tanto um ensaio de coloração de ácido nucleico fluorescente (descrito no Exemplo 5B) como um ensaio de cromatografia líquida de alto desempenho validada HPLA. O método de ensaio de HPLC para a determinação de ARC187 em plasma de macaco foi validado por ClinTrials Bio-Research (Montreal, Canada). O estudo de validação cumpriu os regulamentos da United States Food and Drug Administration (FDA) Good Laboratory Practice (GLP) (21 CFR §58). O método de ensaio de HPLC foi validado em relação a: seletividade, linearidade, limite inferior de quantificação (LLOQ), persistência, intra-ensaio de precisão e exatidão, inter-ensaio de precisão e exatidão, estabilidade da solução de solução-mãe, meio de injeção, estabilidade, estabilidade da matriz a curto prazo, estabilidade de congelamento-descongelamento, estabilidade da matriz a longo prazo e integridade de diluição. O intervalo de concentração dinâmica linear usável do ensaio foi determinado 0,080 a 50,0 μM .

O perfil PK medido de ARC187 nestas condições foi conforme com o perfil calculado gerado utilizando somente os parâmetros PK em bólus IV (veja-se Figura 51). A concentração em plasma alvo de 1 μM foi estabelecida em < 5 min pós-dosagem e mantida durante a duração total da infusão. Após conclusão da infusão, o aptâmero mostrou uma semivida de depuração terminal, $t_{1/2}(\beta) \sim 40\text{-}60$ horas.

A atividade farmacodinâmica de ARC 187 (SEQ ID NO: 5) no macaco cinomolgo foi avaliada *ex-vivo* utilizando amostras de plasma recolhidas durante o estudo PK no ensaio de ativação de zimosano previamente descrito com a modificação de que a amostra em plasma de cinomolgo foi diluída 10 vezes em plasma humano a 10 % e então tratada

com 5 mg/ml de zimosano. A ativação de C5, refletida através do aparecimento do produto de clivagem C5a, foi medida através de ELISA específico para C5a de humano (*kit* C5a ELISA, BD Biosciences, San Diego, CA). A concentração de ARC187 ativo em cada amostra foi então quantificada através de comparação com uma curva padrão derivada a partir de ensaios de zimosano utilizando amostras preparadas com níveis conhecidos de ARC187 (veja-se Figura 52). Este estudo indicou que ARC187 mantém a sua atividade anti-complemento durante a duração total seguinte após infusão, a níveis substancialmente consistentes com o perfil farmacocinético descrito acima.

Exemplo 5I: Previsão dos requisitos de dosagem humana

Os requisitos de dosagem humana para prevenção, alívio ou tratamento de complicações relacionadas à cirurgia de CABG são baseados nas seguintes suposições: primeiro, aos pacientes de CABG será administrada uma única dosagem em bólus intravenoso do aptâmero anti-C5 antes de iniciar a cirurgia, seguido por infusão contínua para estabelecer e manter uma concentração em plasma de estado estável de 1,5 μ M durante 24-48 horas após cirurgia CABG. As estimativas da dosagem e taxa de bólus são baseadas em cálculos utilizando os parâmetros farmacocinéticos derivados a partir dos estudos de bólus IV somente e bólus mais infusão previamente descritos em macacos cinomolgos. A dosagem em bólus estimada de ARC187 é 1 mg/kg, e a taxa de infusão associada é 0,0013 mg/kg/min. Para este regime em bólus mais infusão de 48 horas, o requerimento de fármaco total previsto é 0,4 g para ARC187, onde massa se refere a massa de oligonucleótido somente (veja-se coluna 7 no quadro da Figura 53). A coluna 2 da Quadro mostrada na Figura 53 refere-se à massa do grupo PEG conjugado à porção do oligonucleótido de ARC187, a coluna três refere-se à massa molecular da porção de oligonucleótido de ARC187 (e será a mesma para todos os aptâmeros no presente documento que

compreendem ARC186 (SEQ ID NO: 4) como a sua sequência de oligonucleótidos), a coluna 4 refere-se à massa molecular de PEG de 40 kDa conjugado ao ARC186 (SEQ ID NO: 4) por meio de química reativa de amina descrita no exemplo 3C anterior, a coluna 5 refere-se à semivida de fase α de ARC187 num modelo de dois compartimentos, e a coluna seis refere-se à semivida de fase β de ARC187 num modelo de dois compartimentos.

EXEMPLO 6

Interação de Aptâmeros Anti-C5 e Heparina/Protamina

Uma aplicação prevista do aptâmero anti-C5 é como uma profilaxia para a prevenção ou mitigação dos efeitos secundários inflamatórios associados à cirurgia de enxerto de *bypass* da artéria coronária (CABG). Altas concentrações do anticoagulante heparina (3-5 unidades/ml ou 1 - 2 μ M) são tipicamente administradas durante CABG para prevenir trombose e manter a potência nos componentes da bomba de *bypass*; a reversão do efeito da heparina após o procedimento, e a restauração de hemóstase normal é atingida através da administração de concentrações similarmente altas de protamina (5 μ M). Dados os perigos potenciais para pacientes de qualquer interferência na eficácia de qualquer destes fármacos, foi necessário demonstrar que aptâmeros anti-C5 (1) não alteram as atividades de ambos fármacos e (2) não exibem efeitos inerentes na hemóstase que possam complicar o tratamento de anticoagulação do paciente.

A heparina é um polissacarídeo sulfatado com uma carga negativa líquida e uma massa molecular média de aproximadamente 15 kDa que exerce um efeito inibidor sobre numerosas proteases na cascata de coagulação promovendo interações com antitrombina. A protamina, um polipéptido com carga altamente positiva, é capaz de bloquear a atividade da heparina por meio de uma interação pobremente caracterizada que é de natureza pelo menos parcialmente

eletrostática. O núcleo funcional de ARC187 (SEQ ID NO: 5), como a heparina, é altamente aniônico. Consequentemente, é concebível que ARC187 pode ligar não especificamente a sítios de ligação de heparina ou protamina e interfere com as atividades destas moléculas. Os seguintes estudos investigaram as propriedades anticoagulantes inerentes (isto é, como heparina) de ARC 187, os efeitos de ARC187 na função da heparina, os efeitos de ARC187 na neutralização da heparina pela protamina, e os efeitos da protamina nas propriedades de inibição do complemento de ARC 187.

Exemplo 6A: Efeitos *in vitro* de ARC187 na coagulação

Os efeitos inerentes de ARC187 (SEQ ID NO: 5) na coagulabilidade do plasma foram investigados utilizando testes clínicos padrão dos braços extrínsecos e intrínsecos da cascata de coagulação, o tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), respetivamente. Conforme apresentado na Figura 54, a titulação de plasma humano com citrato com concentrações em excesso das doses desenhadas (até 20 μM) resultou em nenhuma alteração no PT, e somente uma ligeira elevação no aPTT.

Para estimar os efeitos *in vitro* de ARC187 na função da heparina e protamina, foi extraído sangue a partir de 3 indivíduos em 4-5 unidades/ml de heparina, doses associadas aos níveis de heparina utilizados na cirurgia de CABG. A coagulabilidade destas amostras foi estimada utilizando o tempo de coágulo ativado (ACT), um teste de coagulação do sangue rotineiramente utilizado para monitorar a atividade da heparina durante a cirurgia. Nestas concentrações de heparina, na ausência de outros aditivos, o ACT foi significativamente prolongado a partir de um valor de linha de base de ~150 segundos a ~500 segundos na presença de 4 U/ml de heparina ou ~800 segundos na presença de 5 U/ml de heparina. A adição de 10 μM de ARC187 a estas amostras teve pouco efeito no tempo de coágulo, demonstrando que ARC187

não interfere com a atividade anticoagulante da heparina.

O efeito anticoagulante da heparina foi prontamente neutralizado através de titulação com protamina até 6-8 μM (4 U/ml de heparina) ou 12 μM (5 U/ml de heparina). Os valores de ACT na presença de heparina e de concentrações neutralizantes de protamina foram essencialmente indistinguíveis da linha de base. Uma vez que o núcleo do ácido nucleico de ARC187 (12 kDa) é de maior massa molecular que protamina (5 kDa), pode ser esperado que concentrações equimolares de ARC187 adicionadas à protamina sejam suficientes para reverter *completamente* a atividade neutralizante de protamina. Contudo, a pré-incubação de protamina com concentrações aproximadamente equivalentes de ARC187 teve pouco efeito sobre o ACT. Amostras de sangue contendo concentrações neutralizantes de protamina exibiram valores semelhantes de ACT na presença ou ausência de 10 μM de ARC187, indicando que ARC187 tem somente um ligeiro efeito, se algum, na atividade de pró-coagulação de protamina. Estes resultados são resumidos na Figura 55.

Exemplo 6B: Efeitos *in vivo* de ARC187 na coagulação

As interações entre a função de heparina e protamina durante a administração concomitante de aptâmero ARC187 anti-C5 (SEQ ID NO: 5), em doses clínicas de heparina e doses clínicas/subclínicas/superclínicas de protamina foram investigadas para determinar se a presença de concentrações em plasmas subclínicas/superclínicas de ARC187 interfere na reversão de anticoagulação da heparina por parte da protamina. Os resultados do estudo são resumidos na Figura 56. Brevemente, os valores de ACT na linha de base não foram afetados por 10 μM (isto é, excesso molar de 10 vezes da dosagem clínica) de ARC187 em todas as doses de heparina testadas. Similarmente, a extensão da anticoagulação por parte da heparina não foi afetada por 10 μM de ARC187. Na ausência de ARC187, a dose eficaz mínima de protamina foi ~ 30 % (dose clínica = 100 %). Além disso, a reversão da

anticoagulação da heparina por 30 % de protamina não foi afetada por excesso molar de 10 vezes da dose clínica (isto é, 10 μM) de ARC187. Conseqüentemente, a utilização de ARC187 para inibição do complemento num ajuste clínico (por exemplo, CABG) não deve ser afetado por parte da utilização concomitante de heparina e protamina em doses típicas.

Exemplo 6C: Efeito de heparina e protamina na função anti-complemento de ARC187

Os efeitos de heparina e protamina sobre a atividade anti-complemento de ARC 187 (SEQ ID NO: 5) foram examinadas em amostras de sangue inteiro em citrato ativado com zimosano, conforme descrito no Exemplo 1. Imediatamente antes da ativação por zimosano, ARC187 foi titulado em amostras de sangue com citrato tratadas sob quatro condições: 1) nenhum tratamento (sem heparina ou protamina); 2) 4 U/ml de heparina; 3) 6 μM de protamina; 4) 4 U/ml de heparina + 6 μM de protamina. Após ativação com zimosano, a ativação de C5 foi quantificada através de medição em ELISA de sC5b-9 no plasma (*kit* ELISA C5b-9, Quidel, San Diego, CA). Para cada condição, os resultados, expressos como percentagem de inibição de ativação de C5 frente a concentração de ARC187, foram indistinguíveis relativamente ao erro (veja-se Figura 57). Em todos os casos foi alcançada inibição completa com 1-2 μM de ARC187. Conseqüentemente, a heparina e a protamina, separadamente ou combinadas em concentrações relevantes para a sua utilização na cirurgia de CABG, não parecem afetar a atividade anti-complemento de ARC187.

EXEMPLO 7

Neovascularização coroidal

A neovascularização coroidal induzida por *laser* é frequentemente utilizada como um modelo para a degeneração macular relacionada com a idade. Também pode ser utilizada como um modelo para a retinopatia diabética. O efeito de administrar os agentes anti-C5 que, em formas de realização

preferidas da presente invenção são os aptâmeros anti-complemento descritos no presente documento, na prevenção, bem como na estabilização e/ou regressão de neovascularização coroidal é avaliado neste modelo conforme descrito abaixo e por Krzystolik, M.G. *et al.*, Arch Ophthalmol., vol. 120, pp 338-346 (2002).

Onde a prevenção de neovascularização coroidal é avaliada, o agente anti-C5, particularmente um aptâmero específico de C5 que liga e inibe a função de proteína C5 do complemento de cinomolgo, é injetado por via intravítrea num olho de cada macaco cinomolgo, enquanto o olho de controlo recebe veículo. Dias a semanas após a injeção de aptâmero, é realizada fotocoagulação a *laser* em ambos olhos de cada macaco cinomolgo. Os olhos de cada animal são monitorizados através de exame oftálmico, fotografia a cor e angiografia de fluoresceína. Onde a incidência da neovascularização coroidal (estimada angiograficamente) é significativamente menor no agente anti-C5, particularmente um aptâmero C5 específico, no olho tratado que no olho de controlo, o agente específico anti-C5 é considerado como sendo eficaz. Onde a prevenção da neovascularização coroidal é avaliada para tratamento com uma combinação de um agente anti-C5 e um agente anti-VEGF e/ou um agente anti-PDGF, o procedimento anterior é seguido exceto que um olho de cada animal é tratado com o agente anti-C5 e agente anti-VEGF e/ou agente anti PDGFe dias a semanas antes de fotocoagulação a *laser*.

Numa outra forma de realização, onde a prevenção da neovascularização coroidal é avaliada, o aptâmero anti-complemento, particularmente um aptâmero que inibe a função de uma proteína de complemento de cinomolgo, tais como C5 ou C3, é injetado por via intravítrea num olho de cada macaco cinomolgo, enquanto o olho de controlo recebe veículo. Dias a semanas após a injeção de aptâmero, é realizada fotocoagulação a *laser* em ambos olhos de cada

macaco cinomolgo. Os olhos de cada animal são monitorizados através de exame oftálmico, fotografia a cor e angiografia de fluoresceína. Onde a incidência de neovascularização coroidal (avaliada angiograficamente) é significativamente menor no olho tratado com aptâmero anti-complemento do que no olho de controlo, o aptâmero anti-complemento é considerado como sendo eficaz. Onde a prevenção de neovascularização coroidal é avaliada para tratamento com uma combinação de um aptâmero anti-complemento e um agente anti-VEGF e/ou um agente anti-PDGF, o procedimento anterior é seguido, exceto que um olho de cada animal é tratado com o aptâmero anti-complemento e agente anti-VEGF e/ou agente anti-PDGF dias a semanas antes da fotocoagulação a laser.

Onde a estabilização e/ou regressão de neovascularização coroidal é avaliada, é realizada fotocoagulação a laser em ambos olhos de cada macaco cinomolgo. Dias a semanas após fotocoagulação a laser, um agente anti-C5 da presente invenção é administrado através de injeção intravítrea a um olho de cada animal, enquanto o outro olho recebe veículo. Numa forma de realização este agente anti-C5 é um aptâmero anti-complemento. Numa forma de realização preferida, o dito aptâmero anti-complemento é um aptâmero que inibe C5 e/ou C3. Os olhos de cada animal são monitorizados através de exame oftálmico, fotografia a cor e angiografia de fluoresceína. Onde a incidência de neovascularização coroidal (avaliada angiograficamente) é a mesma e/ou significativamente menor no olho tratado com agente anti-C5, particularmente tratado com aptâmero C5, do que no olho de controlo, o aptâmero é considerado como sendo eficaz para estabilização e/ou regressão respetivamente. Onde estabilização e/ou regressão de neovascularização coroidal é estimada para tratamento com uma combinação de um agente anti-C5 e um agente anti-VEGF e/ou um agente anti-PDGF, o procedimento anterior é seguido, exceto que um olho de cada animal é tratado com o

agente anti-C5 e agente anti-VEGF e/ou agente anti-PDGF e dias a semanas após fotocoagulação a *laser*.

Semelhante à estimativa do macaco cinomolgo descrita imediatamente acima, a eficácia de um agente anti-C5 e aptâmeros anti-complemento na prevenção, estabilização e/ou regressão da neovascularização coroidal em separado ou em combinação com um agente anti-VEGF e/ou agente anti-PDGF pode ser avaliada em ratinhos ou outras espécies utilizando um agente anti-C5 que modula proteína do complemento C5 de ratinho, ou proteína do complemento C5 de outras espécies. Numa outra forma de realização, semelhante à mesma avaliação de macaco cinomolgo descrita acima, a eficácia de um aptâmero anti-complemento na prevenção, estabilização e/ou regressão de neovascularização coroidal em separado ou em combinação com um agente anti-VEGF e/ou agente anti-PDGF pode ser avaliada em ratinhos ou outras espécies utilizando um aptâmero anti-complemento que modula, particularmente inibe, a proteína do complemento de ratinho de interesse, ou proteína do complemento de outras espécies de interesse. Veja-se, por exemplo, Bora *et al.*, *Journal of Immunology*, 174: 491-497 (2005).

EXEMPLO 8

Modelo de Ratinho de Degeneração da Retina para DRMI não exsudativo

Um modelo de ratinho tendo uma mutação ou na proteína 1 quimioatratadora de monócitos (MCP-1 ou Ccl-2) ou no seu recetor de quimiocina C-C 2 (Ccr-2) cognato imita os sintomas da degeneração macular relacionada com a idade humana, incluindo desenvolvimento de drusas, atrofia de fotorrecetores e neovascularização coroidal. Veja-se Ambati *et al*, *Nature Medicine*. 2003 Nov 2003; 9(11): 1390-7. Este modelo de ratinho exhibe acumulação significativa de C5 no epitélio pigmentar da retina e coroide, indicando que o complemento é expresso em associação com a doença. Adicionalmente, CD46 (um regulador do complemento ligado à

membrana), vitronectina (um regulador de MAC) e C3c (um produto da degradação de C3b) estão presentes no epitélio pigmentar da retina e/ou coroides sugerindo que está a ocorrer ativação do complemento.

Onde é avaliada a estabilização e/ou regressão da degeneração da retina, o aptâmero anti-complemento da invenção, um aptâmero inibidor de C5 ou C3 de ratinho por exemplo, é administrado através de injeção por via intravítrea a um olho de cada animal enquanto o outro olho recebe veículo. Os olhos de cada animal são monitorizados para a degeneração da retina, incluindo acumulação de produto do complemento no RPE/coroide, desenvolvimento de eletrofisiologia anormal e/ou atrofia localizada do RPE e/ou fotorreceptores, e incidência de neovascularização coroidal. Onde a incidência de degeneração da retina é a mesma e/ou significativamente menor no olho tratado com aptâmero anti-complemento, particularmente tratado com aptâmero anti-C5 ou anti-C3, do que no olho de controle, o aptâmero é considerado como sendo eficaz para estabilização e/ou regressão respetivamente.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Archemix Corporation, *et al.*

<120> APTÂMEROS DE LIGAÇÃO AO COMPLEMENTO E AGENTES ANTI-C5 ÚTEIS NO TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS OCULARES

<130> 23239-591-061

<140> Ainda Não Assignado

<141> 08-03-2007

<150> U.S.S.N. 60/780.905

<151> 08-03-2006

EP2596807B1

<150> U.S.S.N. 60/848.274

<151> 29-09-2006

<160> 102

<170> PatentIn versão 3.2

<210> 1

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<223> citosina nas posições 3, 4, 6 e 37 são 2'-fluoro

<220>

<221> misc_feature

<223> uridina nas posições 9, 30 e 31 são 2'-fluoro

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n na posição 1 é citidina 2'-fluoro ou citidina 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n na posição 2 é guanossina 2'-OH ou guanossina 2'-O-metilo

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n na posição 7 é guanossina 2'-OH ou guanossina 2'-O-metilo

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> n na posição 8 é guanossina 2'-OH ou guanossina 2'-O-metilo

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n na posição 10 é citosina 2'-fluoro ou desoxicitidina

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n na posição 11 é uridina 2'-fluoro ou desoxitimidina

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n na posição 12 é citosina 2'-fluoro ou desoxicitidina

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n na posição 13 é adenosina 2'-OH ou adenosina 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n na posição 14 é guanosina 2'-OH ou guanosina 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n na posição 15 é guanosina 2'-OH ou guanosina 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n na posição 16 é citosina 2'-fluoro ou desoxi citidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n na posição 18 é citosina 2'-fluoro ou citosina 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> n na posição 19 é uridina 2'-fluoro ou uridina 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n na posição 20 é guanosina 2'-OH ou guanosina 2'-

O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> n na posição 21 é adenosina 2'-OH ou adenosina 2'-O-metilo

<220>

<221 > misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n na posição 22 é guanosina 2'-OH-ou guanosina 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n na posição 23 é uridina 2'-fluoro ou desoxiimidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> n na posição 24 é citosina 2'-fluoro ou desoxicitidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n na posição 25 é uridina 2'-fluoro ou desoxiimidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n na posição 26 é guanosina 2'-OH ou guanosina 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> n na posição 27 é adenosina 2'-OH ou adenosina 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> n na posição 28 é guanosina 2'-OH ou guanosina 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> n na posição 29 é uridina 2'-fluoro ou desoxi timidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> n na posição 32 é adenosina 2'-OH ou adenosina 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> n na posição 33 é citosina 2'-fluoro ou desoxi citidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> n na posição 34 é citosina 2'-fluoro ou desoxi
citidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> n na posição 35 é uridina 2'-fluoro ou desoxi
timidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> n na posição 36 é guanosina 2'-OH ou guanosina 2'-
O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> n na posição 38 é guanosina 2'-OH ou guanosina 2'-
O-metilo

<400> 1

nnccgcnnun nnnnnngnnn nnnnnnnnnu unnnnncn 38

<210> 2

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2¹-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi, e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<400> 2

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 3

<211> 42

<212> ARN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<400> 3

gacgaugcgg ucucaugcgu cgagugugag uuuaccuucg uc 42

<210> 4

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e na posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 4

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 5

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> citosina na posição 1 é modificada por um PEG (1,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida)) ramificado de 40 kDa unido ao nucleótido via um ligante de amina

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e na posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 5

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 6

<211> 44

<212> ARN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(44)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<400> 6

aggacgaugc ggucucaugc gucgagugug aguuuaccuu cguc 44

<210> 7

<211> 40

<212> ARN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 2, 7 e 19, em que guanosina é 2'-OH, e posições 1 e 34, em que adenosina é 2'-OH

<400> 7

agcgccgcgg ucucagggcg ugagucugag uuuaccugcg 40

<210> 8

<211> 40

<212> ARN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<400> 8

ggcgccgcgg ucucagggcgc ugagucugag uuuaccugcg 40

<210> 9

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16, 24, 33 e 34, em que citidina é desoxi, e nas posições 11, 23, e 25, que são desoxi timidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 9

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcgt 39

<210> 10

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo, exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro, exceto nas posições 10, 12, 16, 24, 33 e 34, em que citidina é desoxi; nas posições 1, 3, e 37, em que citosina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23, e 25, que são desoxi timidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 10
cgccgcgguc tcagggcgug agtctgaguu uaccugcgt 39

<210> 11
<211> 38
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221 > misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as purinas são 2'-O-metilo, exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 1, 3, 10, 12, 16, 24 e 37, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 11
cgccgcgguc tcagggcgug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 12
<211> 38
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 1, 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi, e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 12

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 13

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220> .

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 3, 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e posições 11, 23, e 25, que são desoxi timidina

<400> 13

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 14

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16, 24 e 37, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23, e 25, que são desoxi timidina

<400> 14

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 15

<211> 38
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16, e 24, em que citidina é desoxi; na posição 3, em que citosina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23, e 25, que são desoxi timidina

<400> 15
cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcgt 38

<210> 16
<211> 38
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221 > misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; na posição 37, em que citosina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 16

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 17

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2' -OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas

posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; na posição 1, em que citosina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 17

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 18

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; nas posições 1, 3 e 37, em que citosina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 18

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 19

<211> 38

<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 4, 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23, e 25, que são desoxi timidina

<400> 19
cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 20
<211> 38
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas

posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 6, 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 20

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 21

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 4, 6, 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 21

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 22

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo, exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16, 18 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 22

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 23

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 19, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 23

cgccgcgguc tcaggcgctg agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 24

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas

posições 10, 12, 16, 18 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 19, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 24

cgccgcgguc tcagggcgtg agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 25

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23, 25 e 29, que são desoxi timidina

<400> 25

cgccgcgguc tcagggcgcug agtctgagtu uaccugcg 38

<210> 26

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23, 25 e 30, que são desoxi timidina

<400> 26

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgagut uaccugcg 38

<210> 27

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-etilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23, 25 e 31, que são desoxi timidina

<400> 27

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu taccugcg 38

<210> 28

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23, 25, 29, 30 e 31, que são desoxi timidina

<400> 28

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgagtt taccugcg 38

<210> 29
<211> 38
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as pirimidinas são 2'-flouoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23, 25 e 35, que são desoxi timidina

<400> 29
cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uacctgcg 38

<210> 30
<211> 38
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro exceto nas posições 10, 12, 16, 24, 33 e 34, em que citidina é desoxi; na posição 9, em que uridina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 30

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 31

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; na posição 4, em que citosina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23, e 25, que são desoxi timidina

<400> 31

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 32

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; na posição 6, em que citosina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23, e 25, que são desoxi timidina

<400> 32

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 33

EP2596807B1

<211> 38
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; na posição 4 e 6, em que citosina é 2'-O-etilo; e nas posições 11, 23, e 25, que são desoxi timidina

<400> 33
cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 34
<211> 38
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e na posição 18, em que citosina é 2'-O-metilo

<400> 34

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcg 38

<210> 35

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas

posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e na posição

19, em que uridina é 2'-O-metilo

<400> 35

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcg 38

<210> 36

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; na posição 18, em que citosina é 2'-O-metilo; e na posição 19, em que uridina é 2'-O-metilo

<400> 36

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcg 38

<210> 37

<211> 38

<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; na posição 29, em que uridina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 37
cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 38
<211> 38
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; na posição 30, em que uridina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 38

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 39

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; na

posição 31, em que uridina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 39

cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 40

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; nas posições 29, 30 e 31, em que uridina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 40

cgccgcggucc tcaggcgcuag agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 41

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; na posição 35, em que uridina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 41

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 42

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto na posição

5, em que guanosina é desoxi; na posição 17, em que guanosina é 2'-OH; e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 42

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 43

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto na posição 5, em que guanosina é 2'-OH; na posição 17, em que guanosina é desoxi; e posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

EP2596807B1

<400> 43

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 44

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH; e posição 32, em que adenosina é desoxi

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 44

cgccgcgguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccugcg 38

<210> 45

<211> 40

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 6 e 18, em que guanosina é 2'-OH; e posição 33, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 11, 13, 17 e 25, em que citidina é desoxi; na posição 40, em que citosina é 2'-O-metilo; e nas posições 12, 24 e 26, que são desoxi timidina

<400> 45

gcgucgcggu ctcaggcgcu gagtctgagu uuaccuacgc 40

<210> 46

<211> 38

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH; e posição 32, em que adenosina é desoxi

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 10, 12, 16 e 24, em que citidina é desoxi; nas posições 36, 37 e 38 em que citosina é 2'-O-metilo; e nas posições 11, 23 e 25, que são desoxi timidina

<400> 46

ggg'gcg’cguc tcaggcgcug agtctgaguu uaccuccc 38

<210> 47

<211> 40

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 6 e 18, em que guanossina é 2'-OH; e posição 33, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 11, 13, 17 e 25, em que citidina é desoxi; na posição 40, em que citosina é 2'-O-metilo; e nas posições 12, 24 e 26, que são desoxi timidina

<400> 47

gcgccgcggu ctcaggcgcu gagtctgagu uuaccugcgc 40

<210> 48

<211> 45

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(44)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 8 e 20, em que guanossina é 2'-OH; e posição 35 em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(44)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>

<221> misc_feature

<222> (45)..(45)

<223> timidina na posição 45 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 48

ggacgccgcg gucucaggcg cugagucuga guuuaccugc gucut 45

<210> 49

<211> 42

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 7 e 19, em que guanosina é 2'-OH; e na posição 34, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> all citosinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 12, 14, 18, 26, 35 e 36, que são desoxi citidina; e nas posições 20, 41 e 42, em que citosina é 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as uridinas são 2'-fluoro; exceto na posição 21, em que uridina é 2'-O-metilo; e nas posições 13, 25, 27, 31 e 37, que são desoxi timidina

<400> 49

ggcgccgcgg uctcagggcg ugagtctgag tuuacctgcg cc 42

<210> 50

<211> 42

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 7 e 19, em que guanosina é 2'-OH; e na posição 34, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> all citosinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 12, 14, 18, 26, 35, 36 e 39, que são desoxi citidina; e nas posições 3, 20, 41 e 42, em que citosina é 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> uridina na posição 11 é 2'-fluoro; uridina na posição 21 é 2'-O-metilo; posições 13, 25, 27, 31, 32, 33 e 37 são desoxi timidina

<400> 50

ggcgccgcgg uctcaggcgc ugagtctgag tttacctgcg cc 42

<210> 51

<211> 42

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 7 e 19, em que guanosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> citosina nas posições 5, 6, 8, 12, 14, 18, 26, 35, 36 e 39 são desoxi citidina; e citosina nas posições 3, 20, 41 e 42 são 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> uridina na posição 21 é 2'-O-metilo; posições 11, 13, 25, 27, 31, 32, 33 e 37 são desoxi timidina

<400> 51

ggcgccgcgg tctcagggcg ugagtctgag tttacctgcg cc 42

<210> 52

<211> 42

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 7 e 19, em que guanosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> uridina nas posições 13, 21, 25 e 27 são 2'-O-metilo; posições 11, 31, 32, 33 e 37 são desoxi timidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> citosina nas posições 5, 6, 8, 12, 18, 35, 36 e 39 são desoxi citidina; e citosina nas posições 3, 14, 20, 26, 41 e 42 são 2'-O-metilo

<400> 52

ggcgccgcgg tcucagggcg ugagucugag ttacctgcg cc 42

<210> 53

<211> 40

<212> ARN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> adenosina na posição 1 tem uma biotina conjugada à extremidade 5'

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 3, 8 e 20, em que guanosina é 2'-OH; e na

posição 2, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<400> 53

agcgccgcgg ucucagggcgc ugagucugag uuuaccugcg 40

<210> 54

<211> 42

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 7 e 19, em que guanosina é 2'-OH; e na posição 34, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as citosinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 12, 14, 18 e 26, que são desoxi citidina; e nas posições 41 e 42, em que citosina é 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as uridinas são 2'-fluoro; posições 13, 25, e

27 são desoxi timidina

<400> 54

ggcgccgcgg uctcagggcg ugagtctgag uuuaccugcg cc 42

<210> 55

<211> 42

<212> ARN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 7 e 19, em que guanossina é 2'-OH; e na posição 34, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as citosinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 12, 14, 18, 26, 41 e 42, em que citosina é 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> todas as uridinas são 2'-fluoro; exceto nas posições 13, 25, e 27, em que uridina é 2'-O-metilo

<400> 55

ggcgccgcgg ucucagggcg ugagucugag uuuaccugcg cc 42

EP2596807B1

<210> 56
<211> 39
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 56
cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 57
<211> 39
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto na posição 18, em que citosina é 2'-O-metilo; e na posição 19 em que uridina é 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH; e na posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 57

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 58

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto na posição 29, que é desoxi timidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH; e na posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 58

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugagtu uaccugcgt 39

<210> 59

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto na posição 18, em que citosina é 2'-O-metilo; e posição 19, em que uridina é 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 59

cgccgcgguc ucagggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 60

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro; exceto na posição 18, em que citosina é 2'-O-metilo; na posição 19, em que uridina é 2'-O-metilo; e na posição 29, que é desoxi timidina

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 60

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugagtu uaccugcgt 39

<210> 61

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> citosina na posição 1 é modificada por um PEG de 20 kDa unido ao nucleótido via um ligante de amina

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e na posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221 > misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 61

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 62

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> citosina na posição 1 é modificada por um PEG de 30 kDa unido ao nucleótido via um ligante de amina

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e na posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 62

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 63

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> citosina na posição 1 é modificada por um ligante de amina 5'

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e na posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 63

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 64

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> citosina na posição 1 é modificada por a 10 kDa PEG unido ao nucleótido via um ligante de amina

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e na posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3'
invertida (3'-3' ligado)

<400> 64
cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 65
<211> 39
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> citosina na posição 1 é modificada por um PEG de 40
kDa linear unido ao nucleótido via um ligante de amina

<220>
<221 > misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas
posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e na posição
32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3' invertida (3'-3' ligado)

<400> 65

cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 66

<211> 38

<212> ARN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> citosina na posição 1 é modificada por um PEG de 20 kDa unido ao nucleótido via um ligante de amina

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanossina é 2'-OH, e na posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>

<221> misc_feature
<222> (38)..(38)
<223> guanosina na posição 3B é modificada por um PEG de 20 kDa unido ao nucleótido via um ligante de amina

<400> 66
cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcg 38

<210> 67
<211> 39
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221 > misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> citosina na posição 1 é modificada por um PEG (2,3-bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoil) ramificado de 40 kDa unido ao nucleótido via um ligante de amina

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> todas as purinas são 2'-O-metilo; exceto nas posições 5 e 17, em que guanosina é 2'-OH, e na posição 32, em que adenosina é 2'-OH

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> timidina na posição 39 é uma desoxi timidina 3'
invertida (3'-3' ligado)

<400> 67
cgccgcgguc ucaggcgcug agucugaguu uaccugcgt 39

<210> 68
<211> 46
<212> ARN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(46)
<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<400> 68
ggcgauuacu gggacggacu cgcgauauga gccagacga cucgcc 46

<210> 69
<211> 40
<212> ARN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature

EP2596807B1

<222> (1)..(40)

<223> todas as pirimidinas são 2'-fluoro

<400> 69

ggcuucugaa gauuauuucg cgaugugaac uccagacccc 40

<210> 70

<211> 92

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> molde sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(69)

<223> n pode ser qualquer nucleótido (a, c, g, ou t)

<400> 70

taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctacn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

nnnnnnnnng gtcgatcgat cgatcátcga tg 92

<210> 71

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador sintético

<400> 71

taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctac 39

EP2596807B1

<210> 72
<211> 23
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> iniciador sintético

<400> 72
catcgatgat cgatcgatcg acc 23

<210> 73
<211> 22
<212> ARN
<213> sequência artificial

<220>
<223> região fixa sintética

<400> 73
gggagaggag agaacguucu ac 22

<210> 74
<211> 23
<212> ARN
<213> sequência artificial

<220>
<223> região fixa sintética

<400> 74
ggucgaucga ucgaucaucg aug 23

<210> 75
<211> 75

EP2596807B1

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(75)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 75

```
gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggggucgauc 60
gaucgaucau cgaug 75
```

<210> 76

<211> 32

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(32)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 76

```
ccuugguuug gcacaggcau acauacgcag gg 32
```

<210> 77

EP2596807B1

<211> 32

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(32)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 77

ccuugguuug gcacaggcau acaaacgcag gg 32

<210> 78

<211> 25

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(25)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 78

ggguuuggca caggcauaca uacc 25

<210> 79

<211> 25

EP2596807B1

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(25)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 79

ggguuuggca caggcauaca aaccc 25

<210> 80

<211> 32

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(32)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 80

ggcggcacag gcauacauac gcaggggucg cc 32

<210> 81

<211> 47

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(47)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 81

cguucuaccu ugguuuggca caggcauaca uacgcagggg ucgaucg 47

<210> 82

<211> 88

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> molde sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(69)

<223> n pode ser qualquer nucleótido (a, t, c, ou g)

<400> 82

```
taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctacn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnng ttaagactag catcgatg 88
```

<210> 83

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> molde sintético

<400> 83

cttggtttgg cacaggcata catacgcagg ggtcgcgcg 39

<210> 84

<211> 39

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador sintético

<400> 84

taatacgact cactataggg agaggagaga acgttctac 39

<210> 85

<211> 19

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador sintético

<400> 85

catcgatgct agtcgtaac 19

<210> 86

<211> 22

<212> ARN

<213> sequência artificial

EP2596807B1

<220>

<223> região fixa sintética

<400> 86

gggagaggag agaacguucu ac 22

<210> 87

<211> 19

<212> ARN

<213> sequência artificial

<220>

<223> região fixa sintética

<400> 87

guuacgacua gcaucgaug 19

<210> 88

<211> 80

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(80)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 88

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggggucgauc 60

gguuacgaçu agcaucgaug 80

<210> 89
<211> 80
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(80)
<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as
pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 89

```
gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggugucgauc    60  
uguuacgacu agcaucgaug                                                    80
```

<210> 90
<211> 80
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(80)
<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as
pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 90

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uaaauacgca gggcucgauc 60
gguuacgacu agcaucgaug 80

<210> 91
<211> 80
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(80)
<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as
pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 91

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcccaggca uauauacgca gggauugauc 60
cguuacgacu agcaucgaug 80

<210> 92
<211> 78
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> aptâmero sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(78)
<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as

pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 92

```
gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcgcaggca uacauacgca ggucgaucgg      60
uuacgacuag caucgaug                                                    78
```

<210> 93

<211> 80

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(80)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-etilo

<400> 93

```
gggagaggag agaacguucu accuuguuu ggcacagcca acccuacgca cggauccgcc      60
gguuacgacu agcaucgaug                                                    80
```

<210> 94

<211> 69

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

EP2596807B1

<221> misc_feature

<222> (1)..(69)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 94

gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uacauacgca ggucgaucgg 60
uuacgacua 69

<210> 95

<211> 79

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(79)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 95

gggagaggag agaacguucu accuuagguu cgcacuguca uacauacaca cgggcaaucg 60
guuacgacua gcaucgaug 79

<210> 96

<211> 75

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(75)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> n pode ser qualquer nucleótido (a, t, u, c, ou g)

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> n pode ser qualquer nucleótido (a, t, u, c, ou g)

<400> 96

```
gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcncaggca uanauacgca cgggucgauc . 60
gguuacgacu agcau                                     75
```

<210> 97

<211> 80

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(80)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 97

```
gggagaggag agaacguucu accuuucucu gccacaagca uaccuucgcg ggguucuauu    60
gguuacgacu agcaucgaug                                                    80
```

<210> 98

<211> 79

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> aptâmero sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(79)

<223> em que todas as purinas são desoxi, e todas as pirimidinas são 2'-O-metilo

<400> 98

```
gggagaggag agaacguucu accuugguuu ggcacaggca uaūauacgca gggucgaucc    60
guuācgcuaā gcaucgaug                                                    79
```

<210> 99

<211> 93

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> molde sintético

<220>

EP2596807B1

<221> misc_feature
<222> (25)..(54)
<223> n pode ser qualquer nucleótido (a, t, c, ou g)

<400> 99

```
catcgatgct agtcgtaacg atccnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnncgagaa 60
cgttctctcc tctccctata gtgagtcgta tta 93
```

<210> 100
<211> 92
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> molde sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(53)
<223> n pode ser qualquer nucleótido (a, t, c, ou g)

<400> 100

```
catgcategc gactgactag ccgnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnngtagaac 60
gttctctctc ctccctatag tgagtcgtat ta 92
```

<210> 101
<211> 92
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> molde sintético

EP2596807B1

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(53)

<223> n pode ser qualquer nucleótido (a, t, c, ou g)

<400> 101

catcgatcga tcgatcgaca gcgannnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngtagaac 60

gttctctect ctccctatag tgagtogtat ta 92

<210> 102

<211> 1676

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> C5 sintético

<400> 102

Met Gly Leu Leu Gly Ile Leu Cys Phe Leu Ile Phe Leu Gly Lys Thr
 1 5 10 15
 Trp Gly Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg
 20 25 30
 Val Gly Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu
 35 40 45
 Ala Phe Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe
 50 55 60
 Ser Tyr Ser Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln
 65 70 75 80
 Asn Ser Ala Ile Leu Thr Ile Gln Pro Lys Gln Leu Pro Gly Gly Gln
 85 90 95
 Asn Pro Val Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser
 100 105 110
 Lys Ser Lys Arg Met Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile
 115 120 125
 His Thr Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg
 130 135 140
 Val Tyr Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Leu Thr Phe Ile Asp Pro Glu Gly Ser Glu Val Asp Met Val Glu Glu

165					170					175					
Ile	Asp	His	Ile	Gly	Ile	Ile	Ser	Phe	Pro	Asp	Phe	Lys	Ile	Pro	Ser
			180					185					190		
Asn	Pro	Arg	Tyr	Gly	Met	Trp	Thr	Ile	Lys	Ala	Lys	Tyr	Lys	Glu	Asp
		195					200					205			
Phe	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ala	Tyr	Phe	Glu	Val	Lys	Glu	Tyr	Val	Leu
	210					215					220				
Pro	His	Phe	Ser	Val	Ser	Ile	Glu	Pro	Glu	Tyr	Asn	Phe	Ile	Gly	Tyr
	225					230					235				240
Lys	Asn	Phe	Lys	Asn	Phe	Glu	Ile	Thr	Ile	Lys	Ala	Arg	Tyr	Phe	Tyr
				245					250					255	
Asn	Lys	Val	Val	Thr	Glu	Ala	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Phe	Gly	Ile	Arg
			260					265					270		
Glu	Asp	Leu	Lys	Asp	Asp	Gln	Lys	Glu	Met	Met	Gln	Thr	Ala	Met	Gln
		275					280					285			
Asn	Thr	Met	Leu	Ile	Asn	Gly	Ile	Ala	Gln	Val	Thr	Phe	Asp	Ser	Glu
		290				295						300			
Thr	Ala	Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Asn
		305				310					315			320	
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ala	Val	Thr	Val	Ile	Glu	Ser	Thr	Gly	Gly	Phe
				325					330					335	
Ser	Glu	Glu	Ala	Glu	Ile	Pro	Gly	Ile	Lys	Tyr	Val	Leu	Ser	Pro	Tyr
			340					345					350		
Lys	Leu	Asn	Leu	Val	Ala	Thr	Pro	Leu	Phe	Leu	Lys	Pro	Gly	Ile	Pro
		355					360					365			
Tyr	Pro	Ile	Lys	Val	Gln	Val	Lys	Asp	Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	Val	Gly
	370					375					380				
Gly	Val	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Ala	Gln	Thr	Ile	Asp	Val	Asn	Gln	Glu
				385		390					395				400

Thr Ser Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly
 405 410 415

Val Ala Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu
 420 425 430

Phe Asn Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala
 435 440 445

Arg Glu Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr
 450 455 460

Leu Tyr Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu
 465 470 475 480

His Leu Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile
 485 490 495

Thr His Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe
 500 505 510

Gly Thr Arg Glu Lys Phe Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile
 515 520 525

Pro Val Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr
 530 535 540

Ile Val Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp
 545 550 555 560

Leu Asn Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser
 565 570 575

Pro Asp Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met
 580 585 590

Ala Thr Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala
 595 600 605

Val Tyr Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe
 610 615 620

Gln Phe Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu
 625 630 635 640

Asn Asn Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn
 645 650 655

Ala Asn Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile
 660 665 670

Leu Arg Pro Arg Arg Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala
 675 680 685

Lys Tyr Lys His Ser Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys
 690 695 700

Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu
 705 710 715 720

Gly Pro Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser
 725 730 735

Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu
 740 745 750

His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr
 755 760 765

Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys
 770 775 780

Gln Leu Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile Gln
 785 790 795 800

Gly Val Gly Ile Ser Asn Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val Lys
 805 810 815

Ala Lys Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser
 820 825 830

Val Val Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr
 835 840 845

Arg Thr Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly
 850 855 860

Ile Cys Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser
 865 870 875 880

Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu Val
 885 890 895

Thr Phe Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe
 900 905 910

Ser Leu Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg
 915 920 925

Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu
 930 935 940

Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro
 945 950 955 960

Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile
 965 970 975

Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu
 980 985 990

Ser Gln Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser Ala
 995 1000 1005

Glu Ala Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His
 1010 1015 1020

Tyr Leu Glu Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro
 1025 1030 1035

Leu Ile Glu Lys Gln Lys Leu Lys Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met
 1040 1045 1050

Leu Ser Ile Met Ser Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val
 1055 1060 1065

Trp Lys Gly Gly Ser Ala Ser Thr Trp Leu Thr Ala Phe Ala Leu

1070						1075						1080			
Arg Val	Leu Gly	Gln Val	Asn	Lys Tyr	Val Glu	Gln	Asn Gln	Asn							
1085			1090			1095									
Ser Ile	Cys Asn	Ser Leu	Leu	Trp Leu	Val Glu	Asn	Tyr Gln	Leu							
1100			1105			1110									
Asp Asn	Gly Ser	Phe Lys	Glu	Asn Ser	Gln Tyr	Gln	Pro Ile	Lys							
1115			1120			1125									
Leu Gln	Gly Thr	Leu Pro	Val	Glu Ala	Arg Glu	Asn	Ser Leu	Tyr							
1130			1135			1140									
Leu Thr	Ala Phe	Thr Val	Ile	Gly Ile	Arg Lys	Ala	Phe Asp	Ile							
1145			1150			1155									
Cys Pro	Leu Val	Lys Ile	Asp	Thr Ala	Leu Ile	Lys	Ala Asp	Asn							
1160			1165			1170									
Phe Leu	Leu Glu	Asn Thr	Leu	Pro Ala	Gln Ser	Thr	Phe Thr	Leu							
1175			1180			1185									
Ala Ile	Ser Ala	Tyr Ala	Leu	Ser Leu	Gly Asp	Lys	Thr His	Pro							
1190			1195			1200									
Gln Phe	Arg Ser	Ile Val	Ser	Ala Leu	Lys Arg	Glu	Ala Leu	Val							
1205			1210			1215									
Lys Gly	Asn Pro	Pro Ile	Tyr	Arg Phe	Trp Lys	Asp	Asn Leu	Gln							
1220			1225			1230									
His Lys	Asp Ser	Ser Val	Pro	Asn Thr	Gly Thr	Ala	Arg Met	Val							
1235			1240			1245									
Glu Thr	Thr Ala	Tyr Ala	Leu	Leu Thr	Ser Leu	Asn	Leu Lys	Asp							
1250			1255			1260									
Ile Asn	Tyr Val	Asn Pro	Val	Ile Lys	Trp Leu	Ser	Glu Glu	Gln							
1265			1270			1275									
Arg Tyr	Gly Gly	Gly Phe	Tyr	Ser Thr	Gln Asp	Thr	Ile Asn	Ala							
1280			1285			1290									

Ile	Glu	Gly	Leu	Thr	Glu	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Lys	Gln	Leu	Arg
	1295					1300					1305			
Leu	Ser	Met	Asp	Ile	Asp	Val	Ser	Tyr	Lys	His	Lys	Gly	Ala	Leu
	1310					1315					1320			
His	Asn	Tyr	Lys	Met	Thr	Asp	Lys	Asn	Phe	Leu	Gly	Arg	Pro	Val
	1325					1330					1335			
Glu	Val	Leu	Leu	Asn	Asp	Asp	Leu	Ile	Val	Ser	Thr	Gly	Phe	Gly
	1340					1345					1350			
Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Val	His	Val	Thr	Thr	Val	Val	His	Lys	Thr
	1355					1360					1365			
Ser	Thr	Ser	Glu	Glu	Val	Cys	Ser	Phe	Tyr	Leu	Lys	Ile	Asp	Thr
	1370					1375					1380			
Gln	Asp	Ile	Glu	Ala	Ser	His	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Gly	Asn	Ser	Asp
	1385					1390					1395			
Tyr	Lys	Arg	Ile	Val	Ala	Cys	Ala	Ser	Tyr	Lys	Pro	Ser	Arg	Glu
	1400					1405					1410			
Glu	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	His	Ala	Val	Met	Asp	Ile	Ser	Leu
	1415					1420					1425			
Pro	Thr	Gly	Ile	Ser	Ala	Asn	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	Val
	1430					1435					1440			
Glu	Gly	Val	Asp	Gln	Leu	Phe	Thr	Asp	Tyr	Gln	Ile	Lys	Asp	Gly
	1445					1450					1455			
His	Val	Ile	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Ile	Pro	Ser	Ser	Asp	Phe	Leu
	1460					1465					1470			
Cys	Val	Arg	Phe	Arg	Ile	Phe	Glu	Leu	Phe	Glu	Val	Gly	Phe	Leu
	1475					1480					1485			
Ser	Pro	Ala	Thr	Phe	Thr	Val	Tyr	Glu	Tyr	His	Arg	Pro	Asp	Lys
	1490					1495					1500			

Gln Cys Thr Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys
 1505 1510 1515

Val Cys Glu Gly Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly
 1520 1525 1530

Gln Met Gln Glu Glu Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg
 1535 1540 1545

Lys Gln Thr Ala Cys Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val
 1550 1555 1560

Ser Ile Thr Ser Ile Thr Val Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys
 1565 1570 1575

Ala Thr Leu Leu Asp Ile Tyr Lys Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu
 1580 1585 1590

Lys Asp Ser Glu Ile Thr Phe Ile Lys Lys Val Thr Cys Thr Asn
 1595 1600 1605

Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg Gln Tyr Leu Ile Met Gly Lys Glu
 1610 1615 1620

Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Ser Phe Arg Tyr Ile Tyr Pro
 1625 1630 1635

Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp Pro Arg Asp Thr Thr
 1640 1645 1650

Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu Asp Glu Phe Ala
 1655 1660 1665

Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys
 1670 1675

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 2005079363 A [0025]
- US 53642890 A [0068]
- US 5475096 A [0068]
- US 5270163 A [0068]
- WO 9119813 A [0068]
- US 5958691 A [0075]
- US 5660985 A [0075] [0086]
- US 5698687 A [0075]
- US 5817635 A [0075]
- US 5672695 A [0075]
- WO 9207065 A [0075]
- US 5707796 A [0083]
- US 5763177 A [0083]
- US 5567588 A [0083]
- US 5861254 A [0083]
- US 5496938 A [0083]
- US 5705337 A [0083]
- US 5580737 A [0084] [0086]
- US 5756703 A [0086]
- US 5674685 A [0087]
- US 5668264 A [0087]
- US 6207816 B [0087]
- US 6229002 B [0087]
- US 5637459 A [0091]
- US 5683867 A [0091]
- US 6011020 A [0091] [0202] [0205] [0236]

- US 6051698 A [0091] [0202] [0205]
- WO 9818480 A [0091]
- US 5648214 A [0092]
- US 43076102 P [0096]
- US 20040197804 A [0096]
- US 20050037394 A [0096]
- US 48747403 P [0096]
- US 51703903 P [0096]
- US 72958103 A [0096]
- US 87385604 A [0096]
- US 69629205 P [0096]
- WO 07005645 A [0096]
- US 480188 A [0096]
- US 20070117112 A [0096]
- US 60550790 B [0160]
- US 20060030535 A [0160]
- US 11075648 B [0160] [0165]
- US 10718833 B [0169]
- US 20040180360 A [0169]
- US 6395888 B [0192]
- US 544542 P [0197]
- US 60547747 B [0197]
- US 60581685 B [0197]
- US 60608048 B [0197]
- WO 05079363 A [0197]
- US 2005039975 W [0201] [0204]
- WO 2006050498 A [0201] [0204]
- US 5919455 A [0202] [0205]
- US 5932462 A [0202] [0205]
- US 6113906 A [0202] [0205]
- US 6147204 A [0202] [0205]
- US 3710795 A [0233]
- US 5262564 A [0236]
- US 60780905 B [0371]
- US 60848274 B [0371]

Documentos de não patente citados na descrição

- **TUCKER et al.** *J. Chromatography B.*, 1999, vol. 732, 203-212 [0010]
- **AVERY et al.** *Ophthalmology*, 2006, vol. 113, 363-372 [0021]
- **HEIER.** *Ophthalmology*, 2006, vol. 113, 633-642 [0022]
- **NOZAKI et al.** Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularisation. *PNAS*, 2006, vol. 103 (7), 2328-2333 [0023]
- **BORA et al.** Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularisation. *The Journal of Immunology*, 2005, vol. 174, 491-497 [0024]
- **RIPOCHE et al.** The complete amino acid sequence of human complement factor. *H. Biochem. J.*, 1988, vol. 249, 593-602 [0033]
- **HAINES et al.** *Science*, 2005, vol. 308, 419-421 [0059]
- **EDWARDS et al.** *Science*, 2005, vol. 308, 421-424 [0059]
- **HAGEMAN et al.** *PNAS*, 2005, vol. 102 (2), 7227-7232 [0059]
- **KLEIN et al.** *Science*, 2005, vol. 308, 385-389 [0059]
- *Science.*, 15 April 2005, vol. 308 (5720), 419-21 [0060]
- *Science.*, 15 April 2005, vol. 308 (5720), 421-4 [0060]
- *Science.*, 15 April 2005, vol. 308 (5720), 385-9 [0060]
- *JAMA.*, 20 April 2005, vol. 293 (15), 18410 [0060]
- **BRAWMAN-MINTZER O.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 1989, vol. 30 (10), 2240-4 [0061]
- **MONDINO BJ.** *Arch Ophthalmol.*, March 1983, vol. 101 (3), 465-8 [0061]
- **MONDINO BJ.** *Arch Ophthalmol.*, August 1981, vol. 99 (8), 1430-3 [0061]
- **FROEHLER et al.** *Nucl. Acid Res.*, 1986, vol. 14, 5399-5467 [0075] [0199]
- **FROEHLER et al.** *Tet. Lett.*, 1986, vol. 27, 5575-5578 [0075] [0199]
- **SOOD et al.** *Nucl. Acid Res.*, 1977, vol. 4, 2557 [0075] [0199]

- HIROSE et al. *Tet. Lett.*, 1978, vol. 28, 2449 [0075]
[0199]
- SPROAT et al. *Nucl. Acid Res.*, 1991, vol. 19, 733-738
[0089]
- COTTEN et al. *Nucl. Acid Res.*, 1991, vol. 19, 2629-2635
[0089]
- HOBBS et al. *Biochemistry*, 1973, vol. 12, 5138-5145
[0089]
- GREEN et al. *Current Biology*, 1995, vol. 2, 683-695
[0097]
- BURMEISTER. *Chemistry and Biology*, 2005, vol. 12, 25-33
[0099]
- PADILLA et al. *Nucleic Acids Research*, 2002, vol. 30, 138
[0099]
- CHELLISERRY, K. ; ELLINGTON, A.D. *Nature Biotech*, 2004,
vol. 9, 1155-60 [0099]
- VIVES et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272 (25), 16010-7
[0165]
- PIETERSZ et al. *Vaccine*, 2001, vol. 19 (11-12), 1397-405
[0165]
- ROTHBARD et al. *Nat. Med.*, 2000, vol. 6 (11), 1253-7
[0165]
- ROTHBARD, J et al. *J. Med. Chem.*, 2002, vol. 45 (17),
3612-8 [0165]
- GREENWALD et al. *J. Org. Chem*, 1995, vol. 60, 331-336
[0170]
- HARRIS et al. *Nature*, 2003, vol. 2, 214-221 [0174]
- ROBERTS et al. *Advanced Drug Deliver Reviews*, 2002, vol.
54, 549-476 [0175]
- HAVILAND et al. *J Immunol.*, 01 January 1991, vol. 146
(1), 362-8 [0188]
- SMITH; WATERMAN. *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482
[0189]
- NEEDLEMAN ; WUNSCH. *J Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443
[0189]

- **PEARSON ; LIPMAN.** *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444 [0189]
- **ALTSCHUL et al.** *J Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0190]
- **ALTSCHUL et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 15, 3389-3402 [0190]
- **MCGINNIS et al.** *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, W20-W25 [0190]
- **EDWARDS et al.** *Science*, 2005, vol. 308, 421-422 [0210]
- **HAGEMAN, G. et al.** *PNAS*, 2005, vol. 102, 7227-7231 [0210]
- **HAINES, J. et al.** *Science*, 2005, vol. 308, 419-421 [0210]
- **GREEN et al.** *Chem. Biol.*, 1995, vol. 2, 683-95 [0250]
- **GONG et al.** *Journal of Clinical Immunology*, 1996, vol. 16, 222-9 [0279]
- **NILSSON et al.** *Blood*, 1998, vol. 92, 1661-7 [0279]
- **EVANS.** *Molecular Immunology*, 1995, vol. 32, 1183-1195 [0306]
- **EVANS.** *Molecular Immunol*, 1995, vol. 32, 1183 [0314]
- **KRZYSTOLIK, M.G. et al.** *Arch Ophthalmol.*, 2002, vol. 120, 338-346 [0364]
- **BORA et al.** *Journal of Immunolgy*, 2005, vol. 174, 491-497 [0368]
- **AMBATI et al.** *Nature Medicine.*, November 2003, vol. 9 (11), 1390-7 [0369]

Lisboa, 10 de Fevereiro de 2016

REIVINDICAÇÕES

1. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a degeneração macular relacionada com a idade (DRMI) de tipo não exsudativo, o método compreendendo a etapa de administração de um aptâmero peguilado ou não peguilado a um indivíduo com necessidade do mesmo, em que o aptâmero peguilado ou não peguilado se liga ao complemento C5 e tem a sequência da SEQ ID NO: 4.

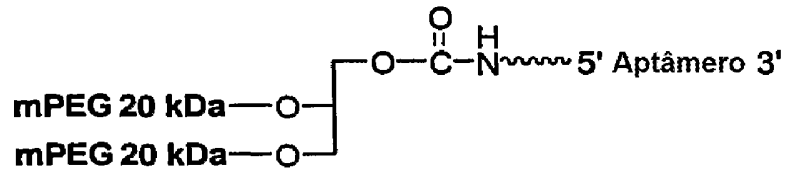
2. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com a reivindicação 1, em que o método compreende adicionalmente a etapa de administrar ao indivíduo um agente anti-VEGF, em que o agente anti-VEGF é um anticorpo ou fragmento de anticorpo antagonista dirigido contra VEGF.

3. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o aptâmero peguilado ou não peguilado ou agente anti-VEGF é administrado através de administração ocular, administração intravítrea ou administração periocular.

4. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o aptâmero peguilado ou não peguilado ou agente anti-VEGF está presente numa formulação de depósito.

5. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização

num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o aptâmero está peguilado e tem a seguinte fórmula:



ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, onde indica um ligante, e

Aptâmero

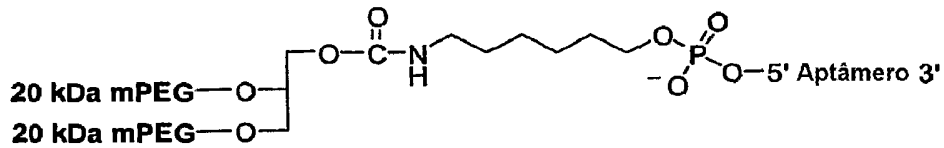
=

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUfUfUAfCf CfUm GfC- mG-3T (SEQ ID NO:4), em que fC e fU = nucleótidos 2'-fluoro, mG e mA = nucleótidos 2'-OMe, todos os outros nucleótidos são 2'-OH e 3T indica uma desoxitimidina invertida.

6. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com a reivindicação 5, em que o ligante é um ligante alquilo.

7. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com a reivindicação 6, em que o ligante alquilo compreende 2 a 18 grupos CH_2 consecutivos.

8. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o aptâmero está peguilado e tem a seguinte estrutura:



ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo,
onde

Aptâmero=
fCmGfCfCGfCmGmGflJfCflJfCmAmGmGfCGfCflJmGmAmGflJfCflJmGmAmG
fUflJfLJAfCf CfUm- GfCmG-3T (SEQ ID NO: 4), em que fC e fU
= nucleótidos 2'-fluoro, mG e mA = nucleótidos 2'-OMe,
todos os outros nucleótidos são 2'-OH e 3T indica uma
desoxitimidina invertida.

9. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8, em que o agente anti-VEGF é um fragmento de anticorpo antagonista dirigido contra VEGF.

10. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com a reivindicação 9, em que o fragmento de anticorpo antagonista dirigido contra VEGF é ranibizumab.

11. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8, em que o agente anti-VEGF é um anticorpo antagonista dirigido contra VEGF.

12. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com a reivindicação 11, em que o anticorpo antagonista dirigido contra VEGF é bevacizumab.

13. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 12, em que o aptâmero peguilado ou não peguilado e o agente anti-VEGF são administrados sequencialmente ou substancialmente simultaneamente.

14. Um aptâmero peguilado ou não peguilado para utilização num método de tratar, estabilizar e/ou prevenir a DRMI de tipo não exsudativo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o método compreende adicionalmente, anteriormente à administração do aptâmero peguilado ou não peguilado ao indivíduo, a etapa de detetar (i) a presença de drusas na ausência de uma perda clínica de acuidade visual ou (ii) uma variação do fator H de complemento do indivíduo, identificando desta forma um indivíduo em risco de desenvolver DMRI de tipo não exsudativo.

Lisboa, 10 de Fevereiro de 2016

Figura 1

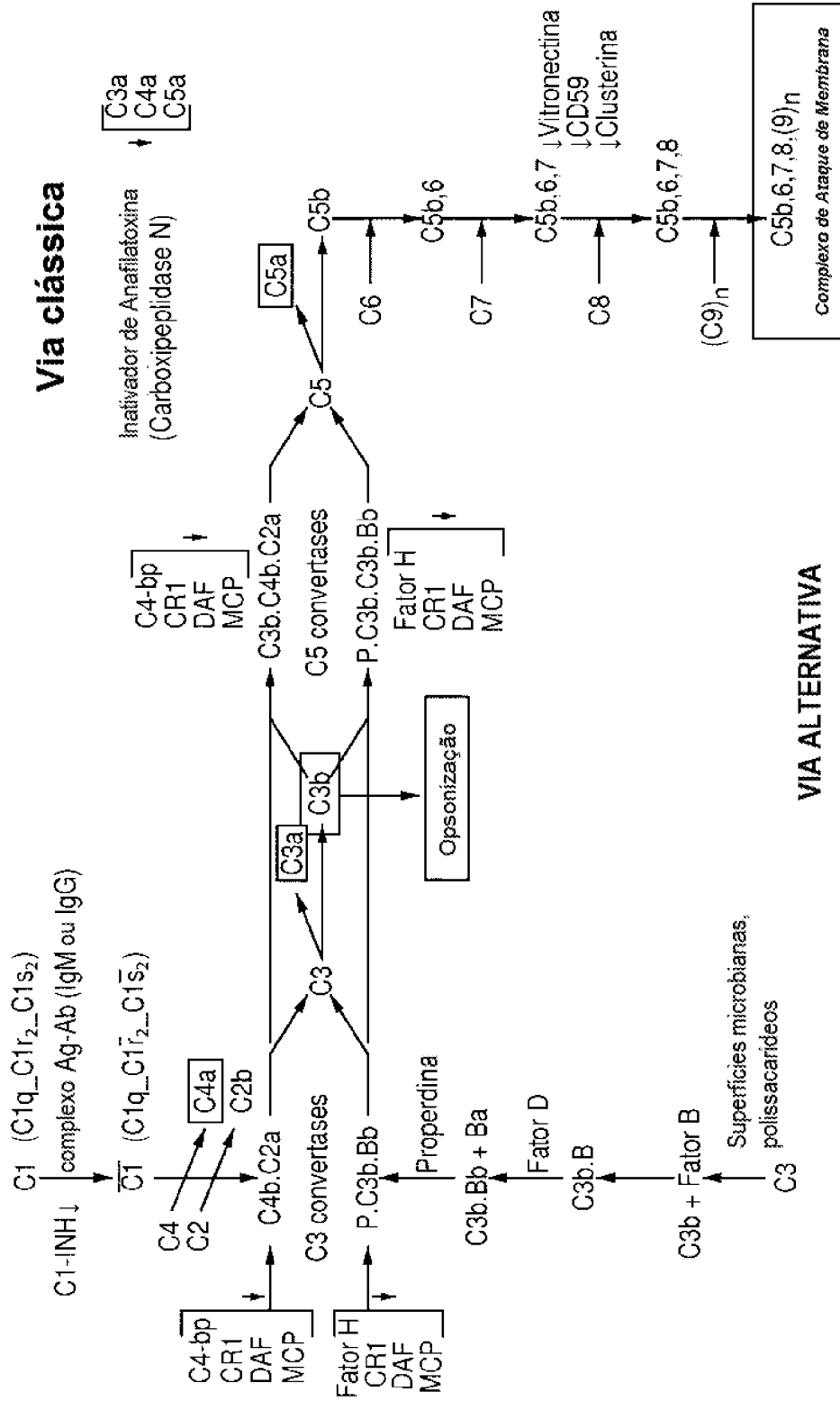


Figura 2

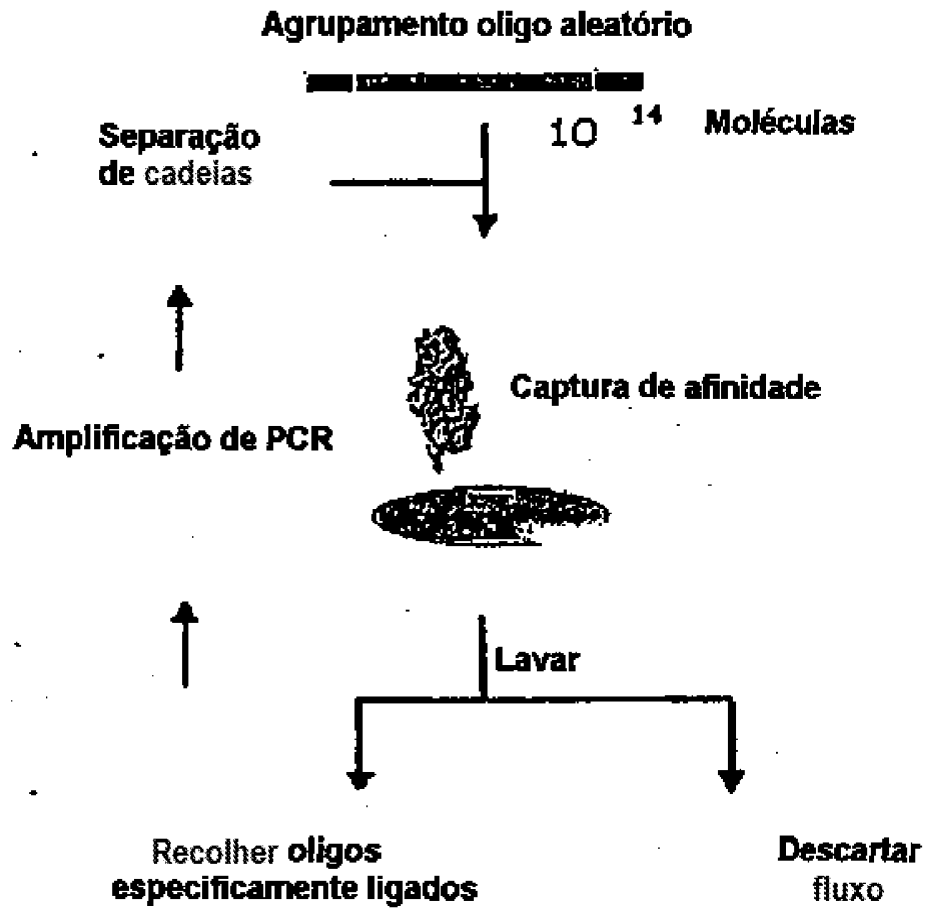
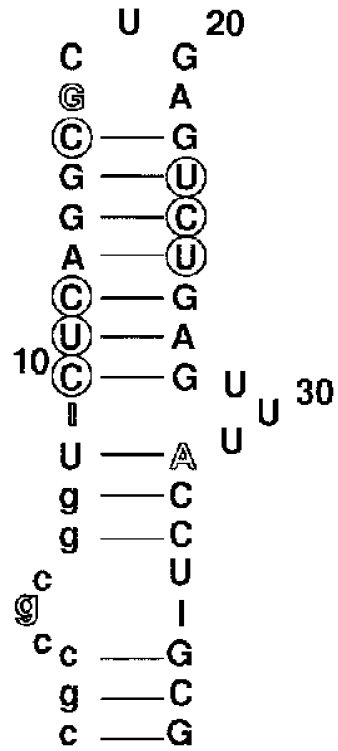
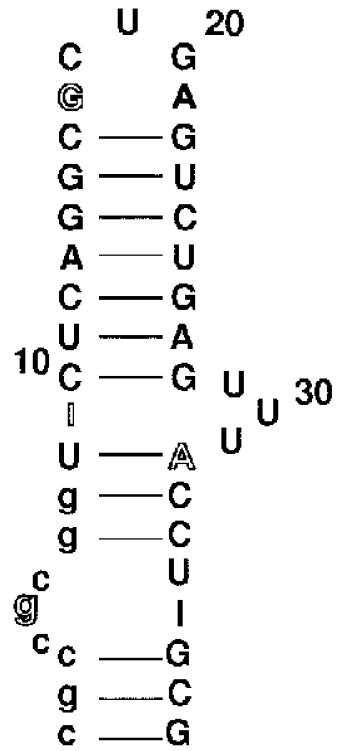


Figura 3B



ARC330 (SEQ ID NO: 2)

Figura 3C



ARC186 (SEQ ID NO: 4)

Figura 4

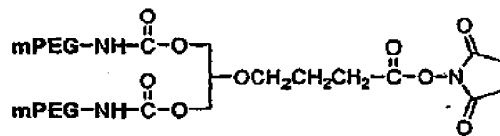


Figura 5

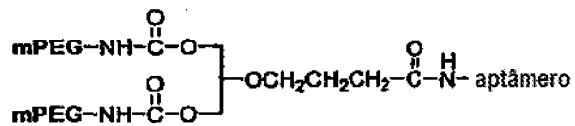
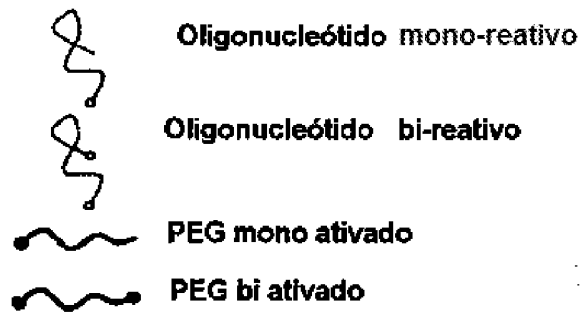
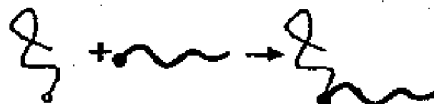


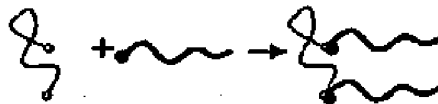
Figura 6



PEGulação padrão



PEGulação múltipla



dimerização por meio de PEGulação

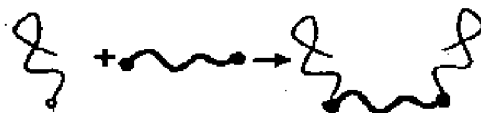


Figura 7A

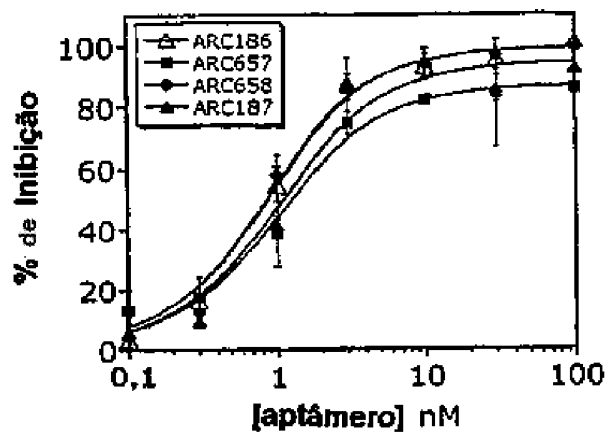


Figura 7B

N° DE ARC	Modificação de PEG	CI50 (nM)
186	Sem PEG	0,5 ± 0,1
657	ARC186 + 20 kDa	0,6 ± 0,1
658	ARC186 + 30 kDa	0,5 ± 0,1
187	1,3 bis(mPEG-[20 kDa])- propil-2-(4'-butamida) ramificado de 40 kDa	0,6 ± 0,2

Figura 7C

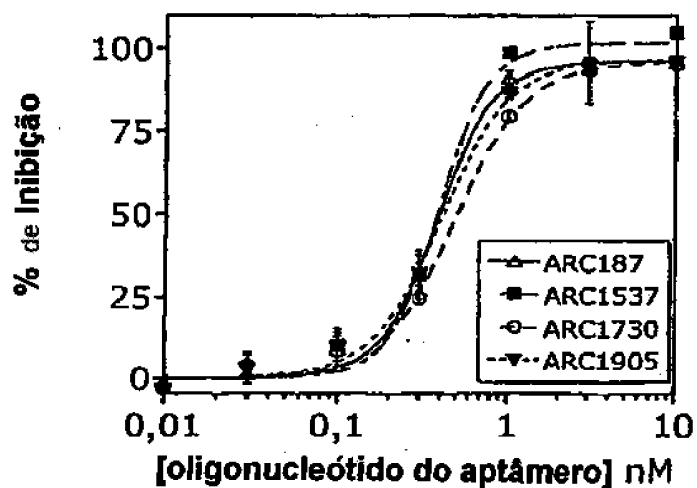


Figura 7D

Nº DE ARC	Modificação de PEG	CI50 (nM)
187	1,3 bis(mPEG-[20 kDa])-propil-2-(4'-butamida) ramificado de 40 K	0,38 ± 0,03
1537	Dow linear de 40 K	0,39 ± 0,06
1730	2 x 20K linear	0,48 ± 0,04
1905	2,3 bis(mPEG-[20 kDa])-propil-1-carbamoilo ramificado de 40 K	0,40 ± 0,03

Figura 8

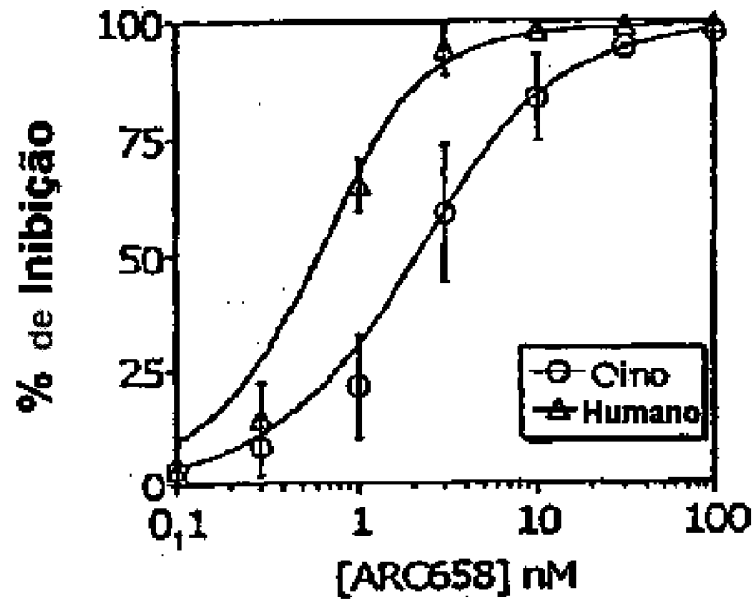


Figura 9

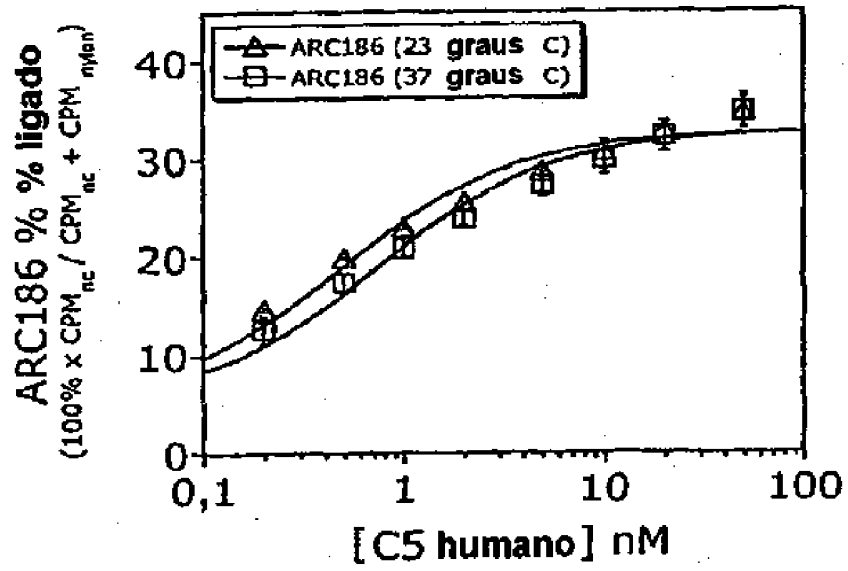


Figura 10

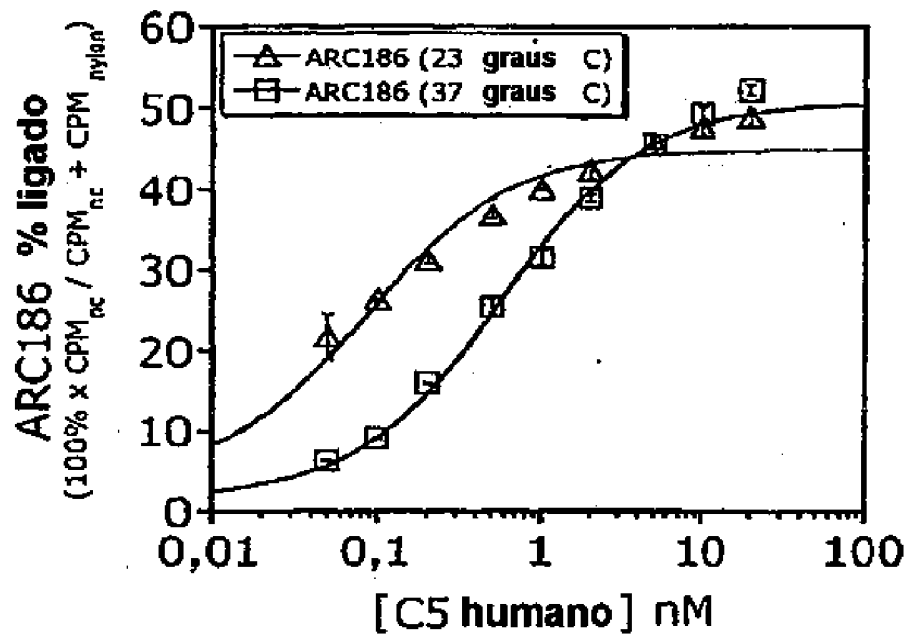


Figura 11

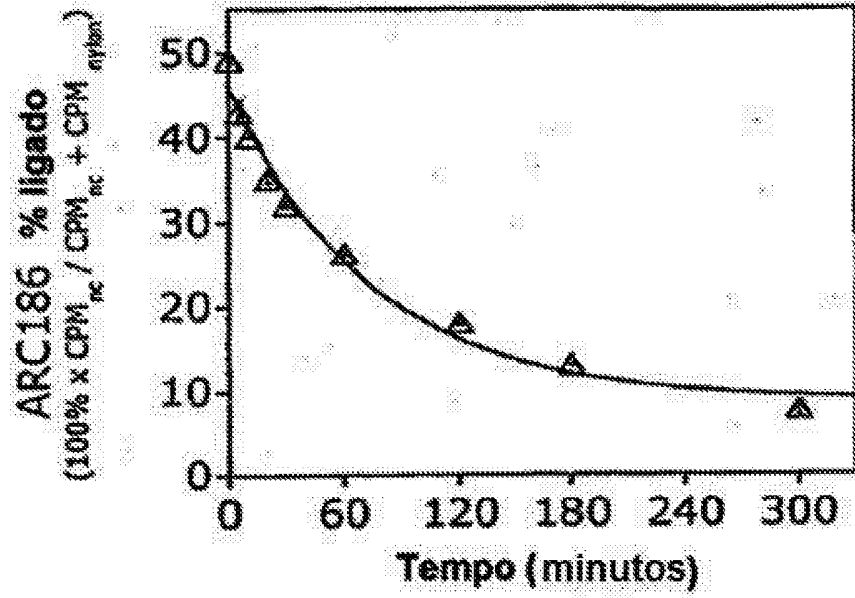


Figura 12

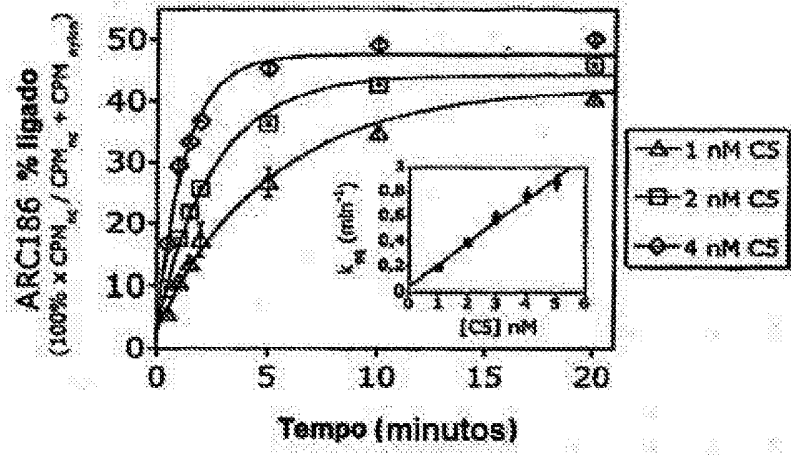


Figura 14

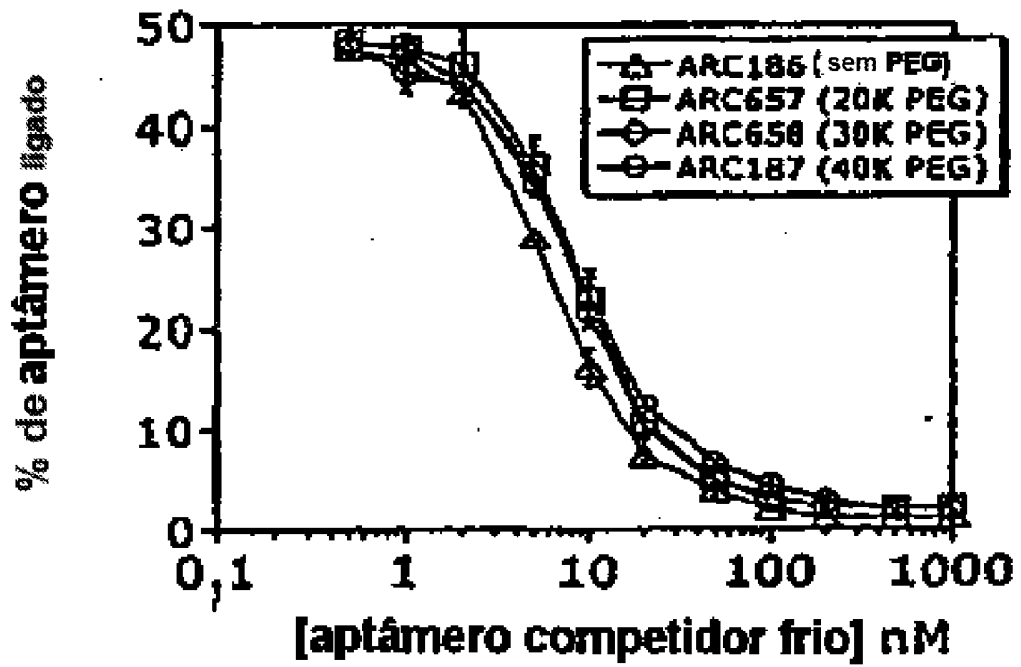


Figura 15

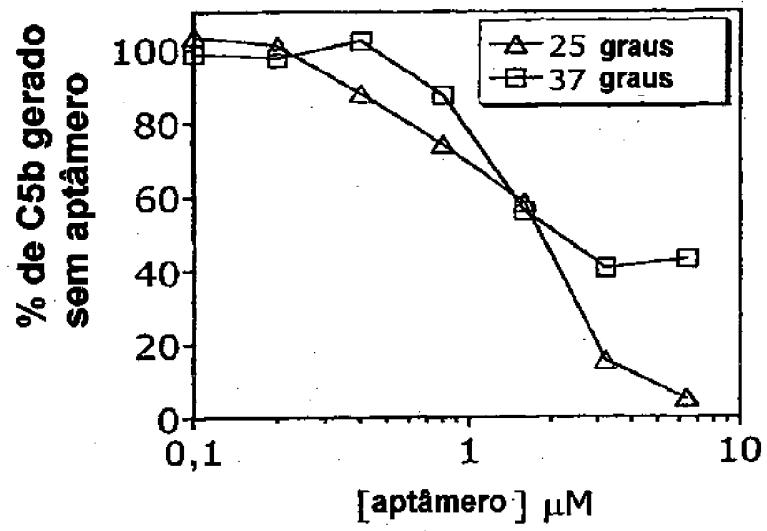


Figura 16

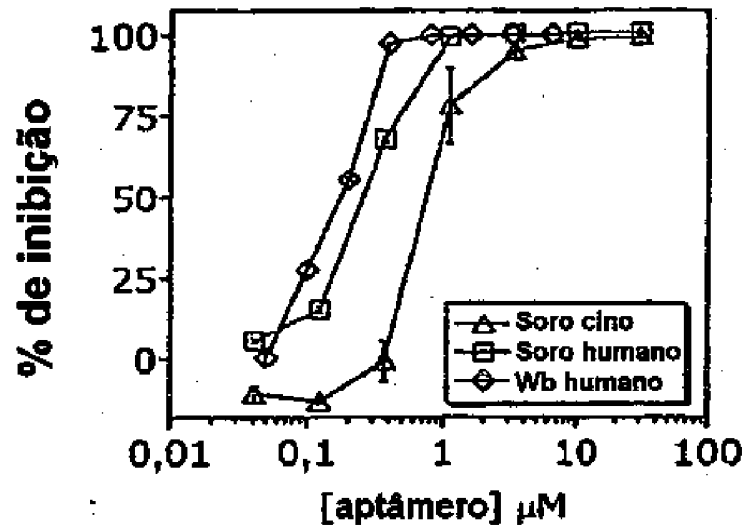


Figura 17

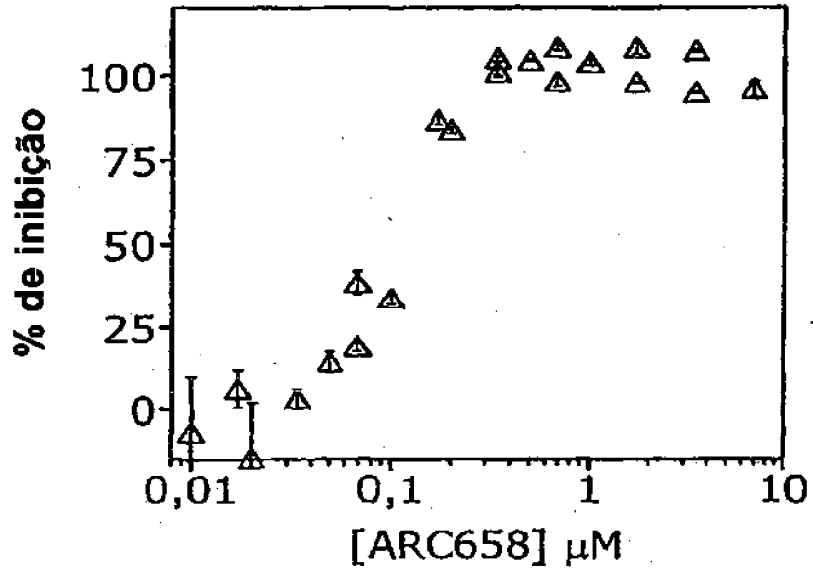


Figura 18

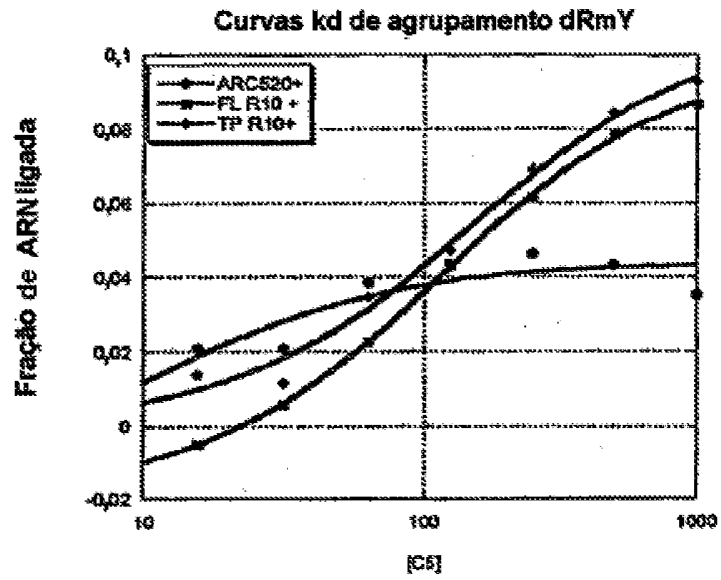


Figura 19

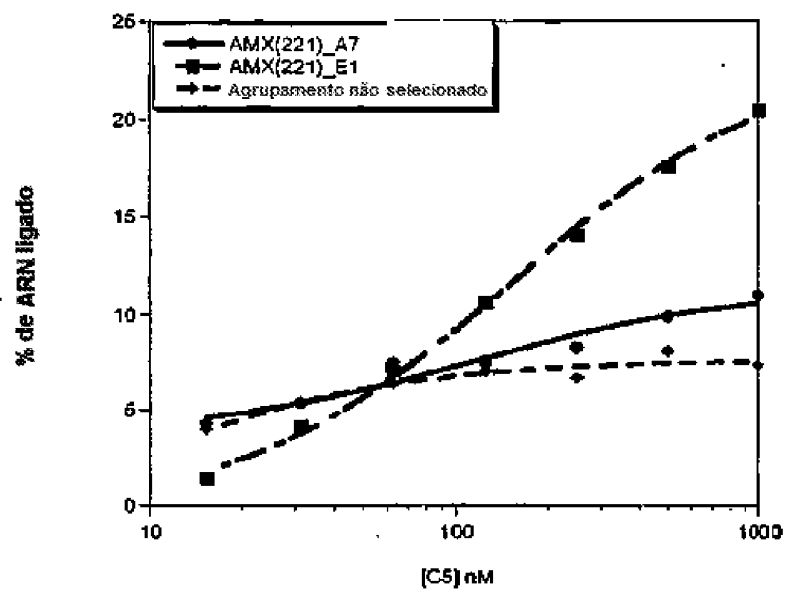


Figura 20

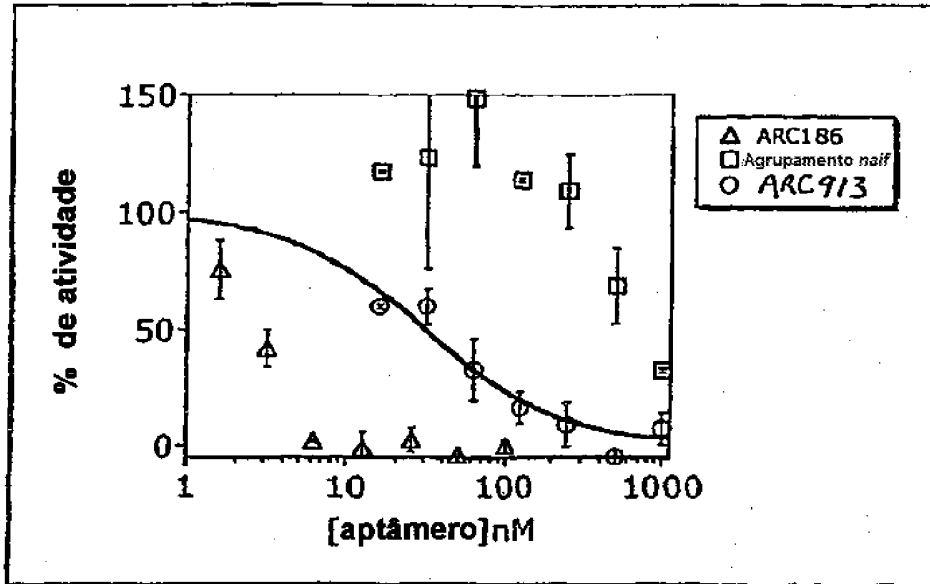
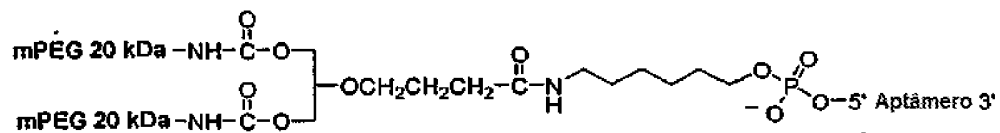


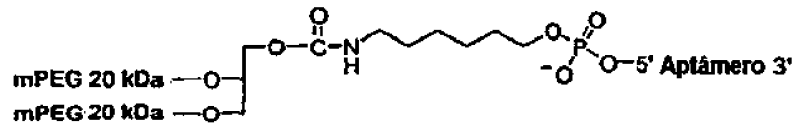
Figura 21



Aptâmero =

$\text{CmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUf}$
 $\text{UafCfCfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO 4)}$

Figura 22



Aptámero =

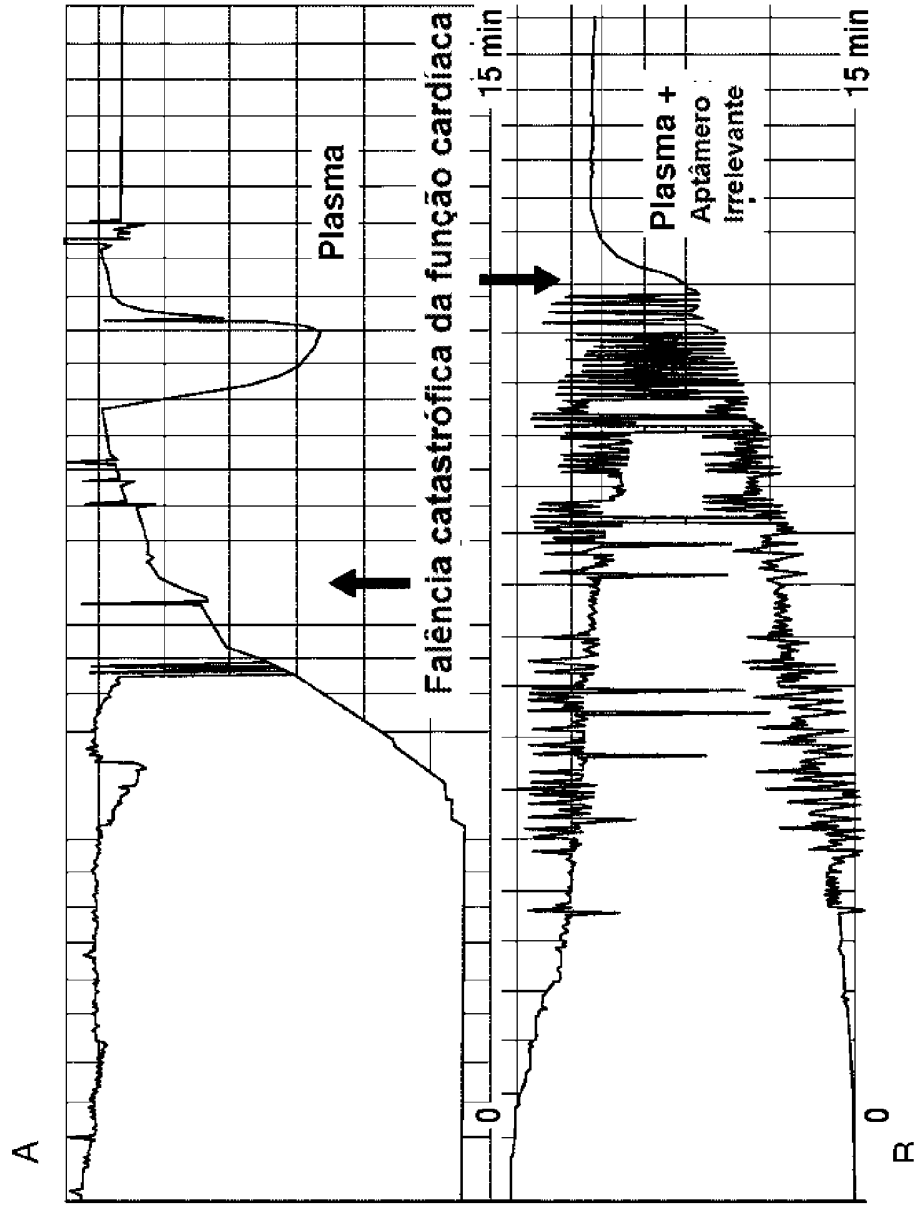
C_mGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUf
UAfCfCfUmGfCmG-3T (SEQ ID NO 4)

ARC1905 (SEQ ID NO: 67)

Figura 23

Grupo	Nº de ratinhos	Artigo de teste	Dose		Medições
			Conc (nM)	Taxa de perfusão ml/min	
1	5	Nenhum aptâmero	0	3	Taxa cardíaca, ritmo, pressão ventricular esquerda
3	3	Aptâmero irrelevante em razão molar 50X	1500	3	Taxa cardíaca, ritmo, pressão ventricular esquerda
4	3	Equivalência molar em ARC186	30	3	Taxa cardíaca, ritmo, pressão ventricular esquerda
5	5	Razão molar 10X em ARC186	300	3	Taxa cardíaca, ritmo, pressão ventricular esquerda
6	4	Razão molar 50X em ARC 186	1500	3	Taxa cardíaca, ritmo, pressão ventricular esquerda

Figura 24



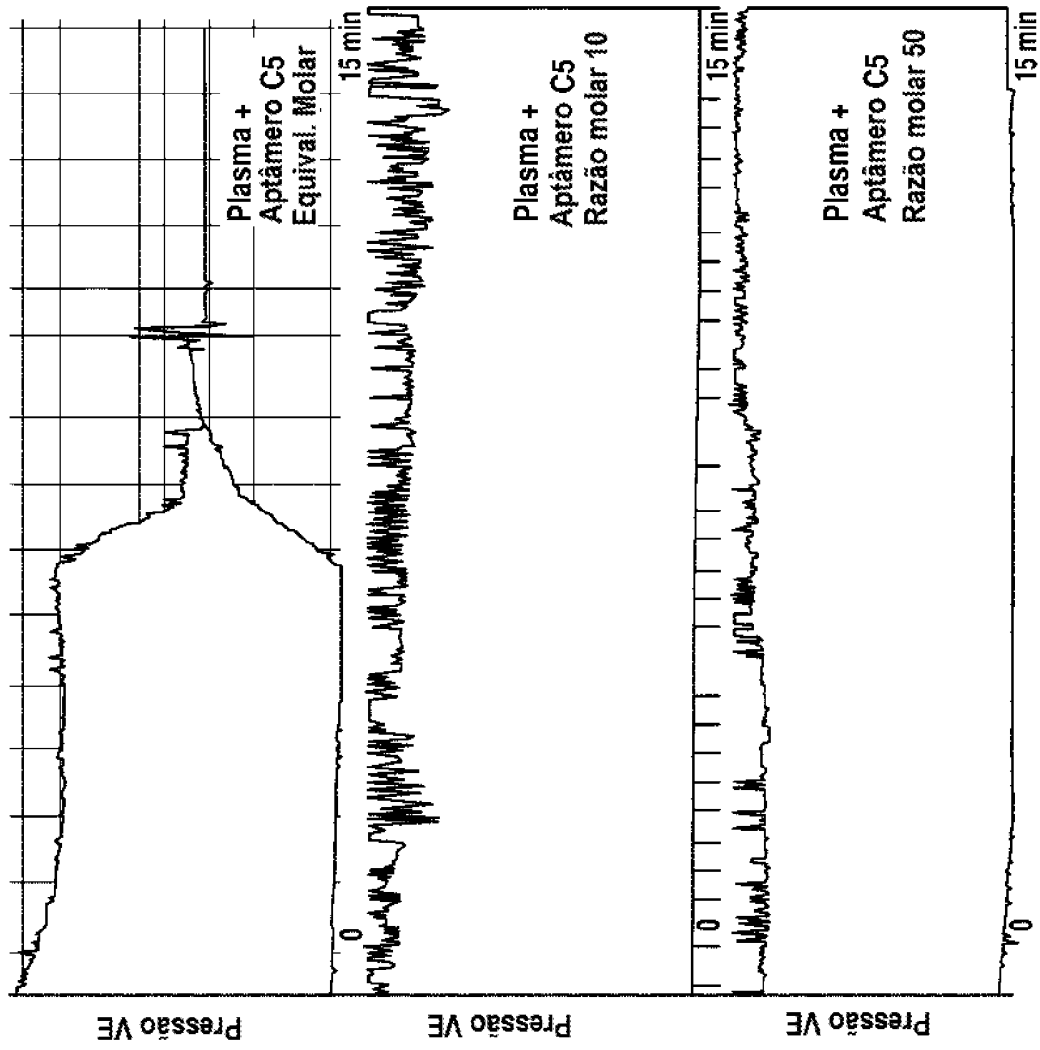


Figura 25

Figura 26

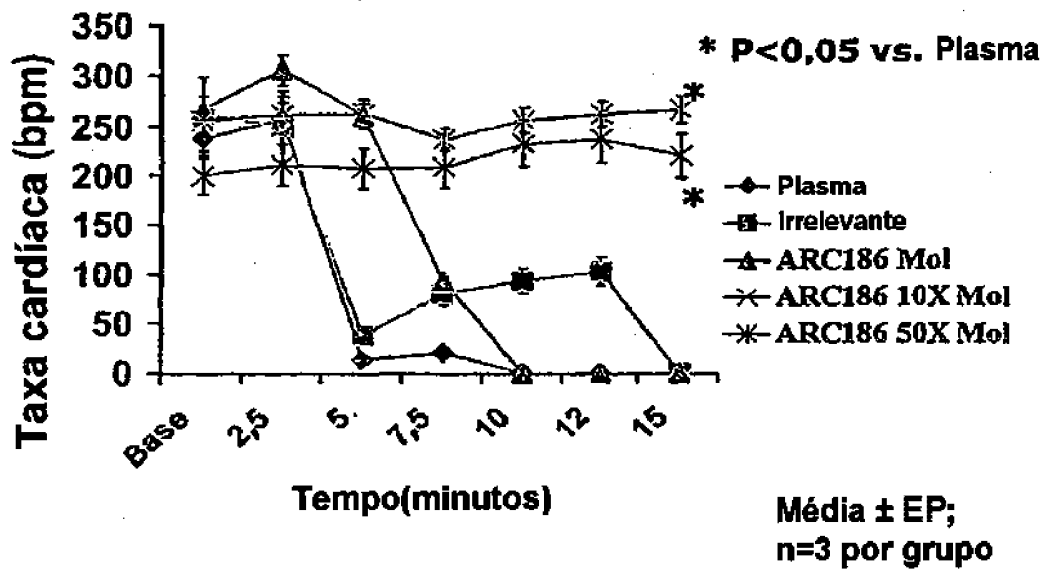


Figura 27

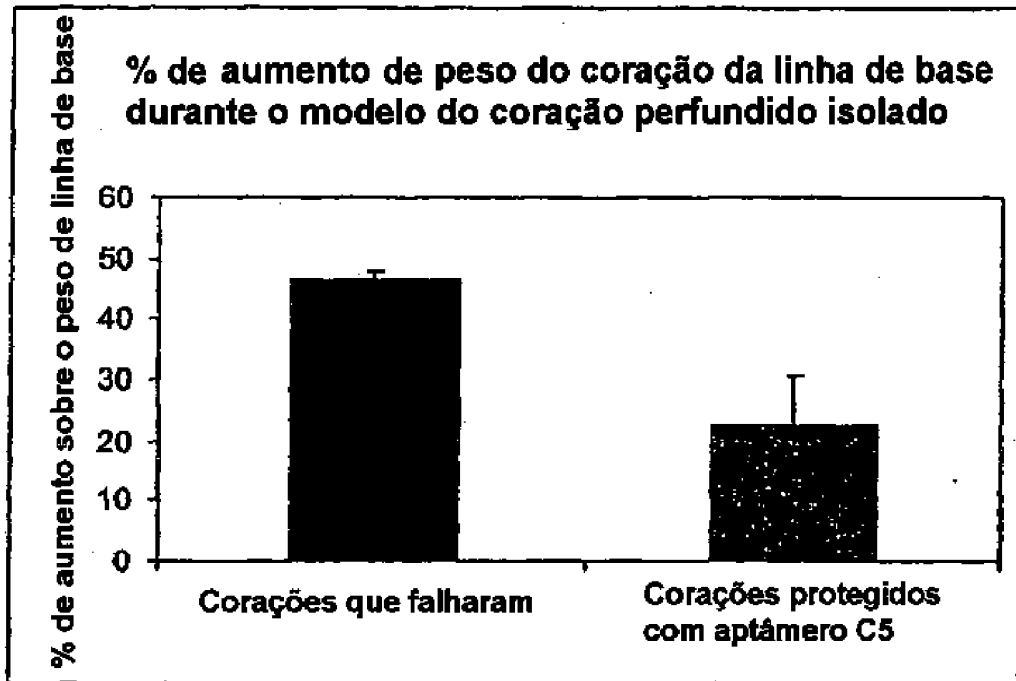


Figura 28

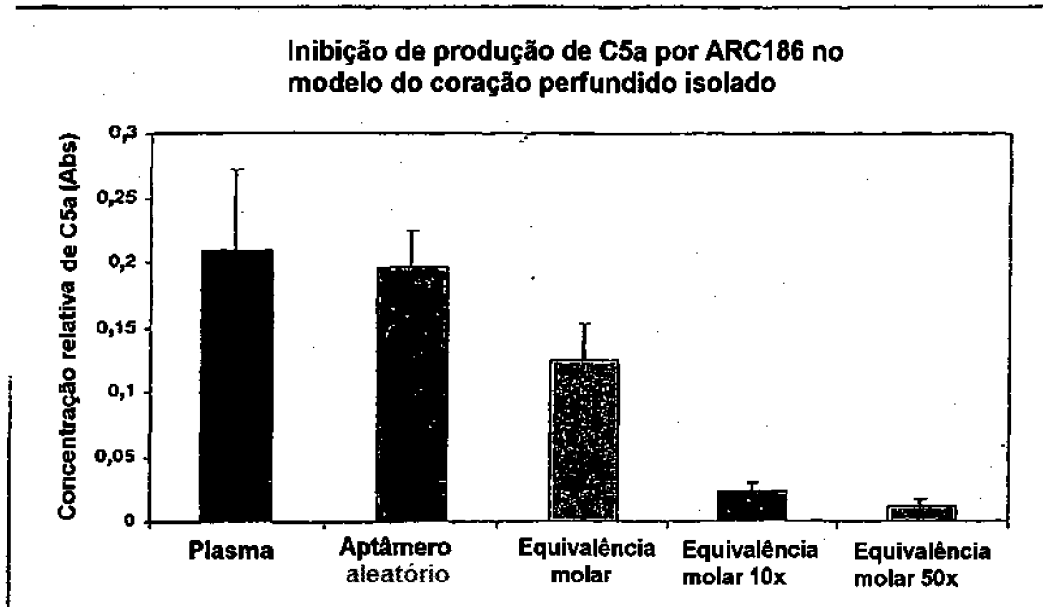


Figura 29

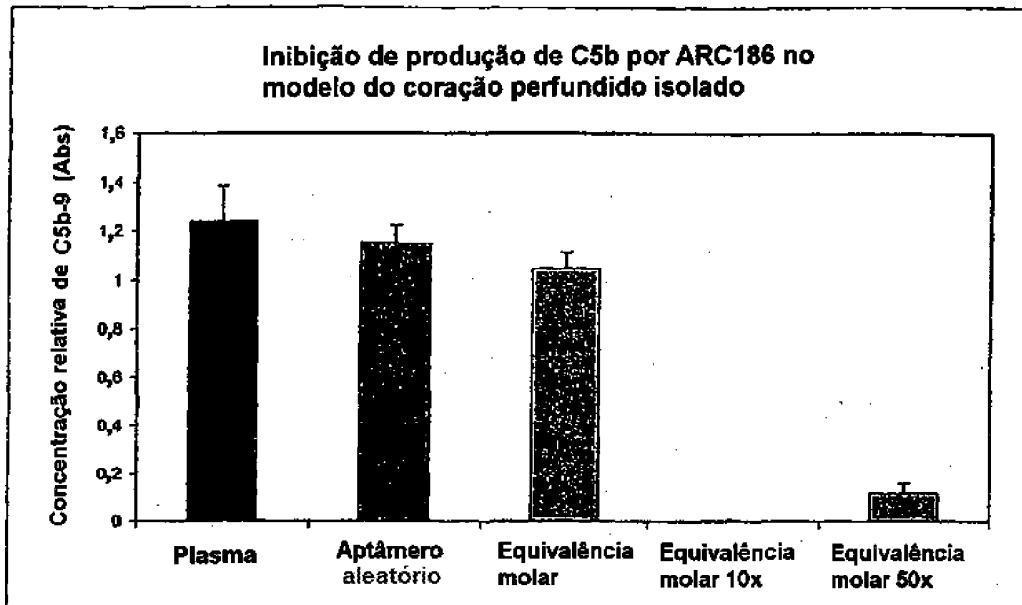


Figura 30

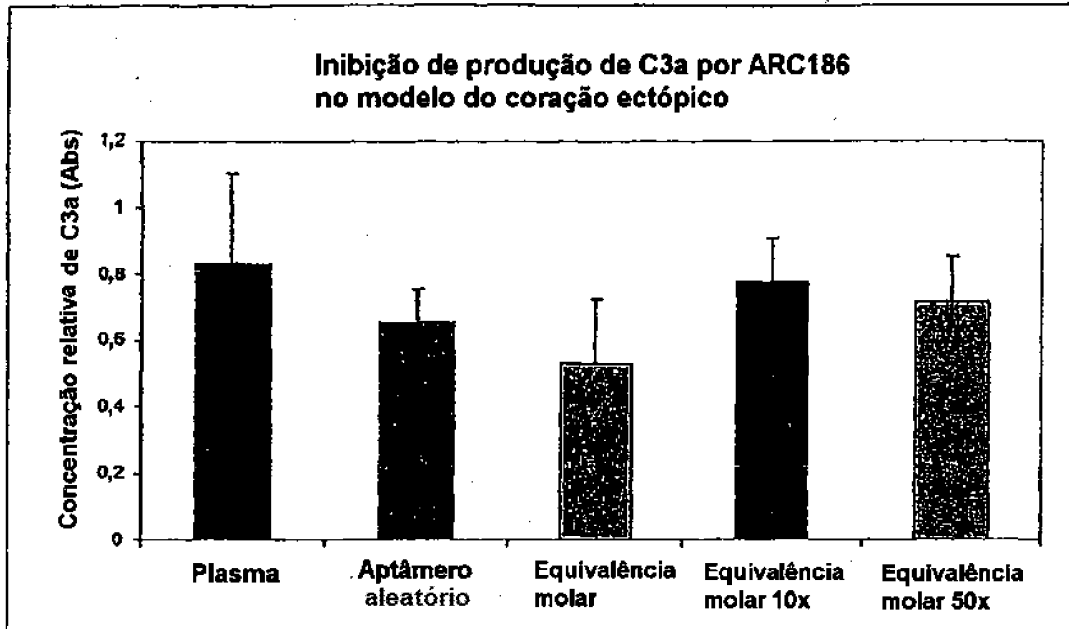


Figura 31

Animal	Tratamento	Irrelevante	C3b	C5b-9
1-001 (1/26)	Nenhum	neg	Pos	pos
1-002 (1-26)	Nenhum	neg	Pos	pos
1-001	Nenhum	neg	Pos	pos
1-002	Nenhum	neg	Pos	pos
1-003	Nenhum	neg	Pos	pos
3-001	Aptâmero Irrelevante 50 x molar	neg	Pos	pos
3-002	Aptâmero Irrelevante 50 x molar	neg	Pos	pos
3-003	Aptâmero Irrelevante 50 x molar	neg	Pos	pos
4-001	Aptâmero C5 equivalência molar	neg	Pos	pos
4-002	Aptâmero C5 equivalência molar	neg	Pos	pos
4-003	Aptâmero C5 equivalência molar	neg	Pos	pos
5-001	Aptâmero C5 equivalência molar 10X	neg	Pos	neg
5-002	Aptâmero C5 equivalência molar 10X:	neg	Pos	neg
5-003	Aptâmero C5 equivalência molar 10X	neg	Pos	neg
5-004	Aptâmero C5 equivalência molar 10X	neg	Pos	neg
5-005	Aptâmero C5 equivalência molar 10X	neg	Pos	neg
6-001	Aptâmero C5 equivalência molar 50X:	neg	Pos	neg
6-002	Aptâmero C5 equivalência molar 50X	neg	Pos	neg
6-003	Aptâmero C5 equivalência molar 50X	neg	Pos	neg
6-004	C5 aptamer 50X molar equivalence	neg	Pos	neg

Figura 32

Animal	Composto	Soro	Razão molar	EDP aumentado	Falência [S ou N]	Tempo até a falência
1-001	ARC658	Humano	0	S	S	4 min 30 s
1-002	ARC658	Humano	0	S	S	4 min 38 s
1-003	ARC658	Humano	0	S	S	3 min 20 s
1-004	ARC658	Humano	0	S	S	12 min 24 s
1-005	ARC658	Humano	0	S	N	NA
1-006	ARC659	Humano	0	S	S	8 min 30 s
1a-001	ARC659	Humano	0,6	S	S	7 min 22 s
1a-002	ARC658	Humano	0,5	S	S	7 min 30 s
1a-003	ARC658	Humano	0,5	S	S	8 min 3 s
2-001	ARC658	Humano	1	N	N	NA
2-002	ARC658	Humano	1	N	N	NA
2-003	ARC658	Humano	1	N	N	NA
2-004	ARC658	Humano	1	N	N	NA
3-001	ARC658	Humano	3	N	N	NA
3-002	ARC658	Humano	3	N	N	NA
3-003	ARC658	Humano	3	N	N	NA
6-001	ARC658	Primata	0	S	S	2 min 30 s
6-002	ARC658	Primata	0	S	S	2 min 47 s
6-003	ARC658	Primata	0	S	S	3 min 30 s
6-004	ARC658	Primata	0	S	S	1 min 28 s
6a-001	ARC658	Primata	3	S	S	5 min 2 s
6a-002	ARC658	Primata	3	S	S	4 min 30 s
6a-003	ARC658	Primata	3	S	S	3 min 43 s
6a-004	ARC658	Primata	3	S	S	8 min 0 s
7-001	ARC658	Primata	10	S	N	NA
7-002	ARC658	Primata	10	S	N	NA
7-003	ARC658	Primata	10	S	S	9 min 15 s
7-004	ARC658	Primata	10	S	N	NA
9-001	ARC658	Primata	20	S	S	12 min 50 s
11-001	ARC658	Primata	30	S	N	NA
11-002	ARC658	Primata	30	S	S	10 min 0 s
11-003	ARC658	Primata	30	S	N	NA
13-001	ARC658	Primata	50	N	N	NA
13-002	ARC658	Primata	50	N	N	NA
13-003	ARC658	Primata	50	N	N	NA

Figura 33

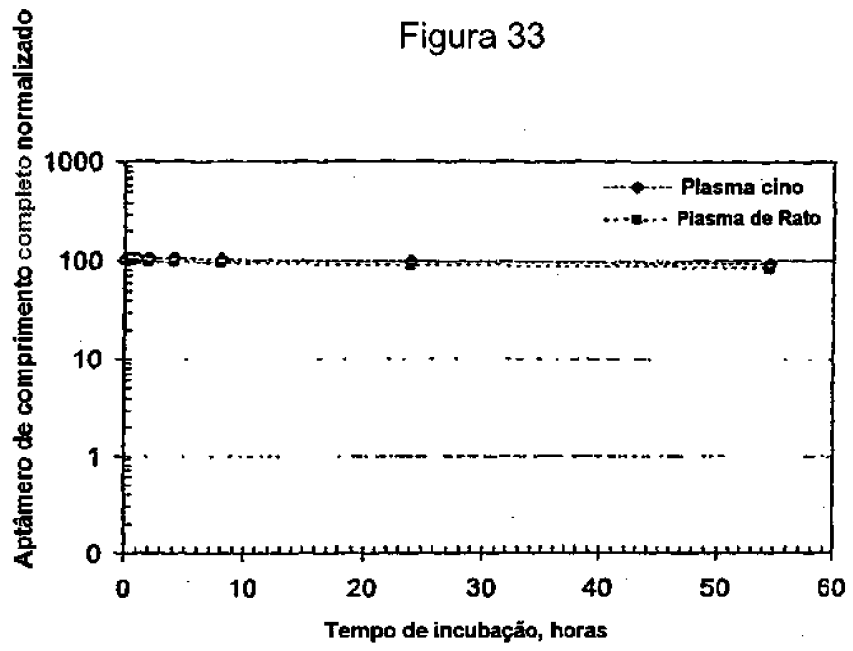


Figura 34

Número de grupo	Número de animais	Artigo de Teste	Nível de dosagem (mg/Kg)	Volume de dose (ml/Kg)	Regime de dosagem	Colheita de amostras
1	3	ARC657 PEG 20 kDa	10	1	Bólus intravenoso no Dia 1	t ₀ pré-dose, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 h
2	3	ARC658 PEG 30 kDa	10	1	Bólus intravenoso no Dia 1	t ₀ pré-dose, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 h
3	3	ARC187 PEG 40 kDa	10	1	Bólus intravenoso no Dia 1	t ₀ pré-dose, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 h

Figura 35

PK de Conjugados de Aptâmero Anti-C5-PEG em Ratos Sprague Dawley						
Aptâmero	ARC657		ARC658		ARC187	
Grupo de PEG	20 kDa		30 kDa		40 kDa	
	MÉDIA	DESV. PAD	MÉDIA	DESV. PAD	MÉDIA	DESV. PAD
Tempo (h)	Cp (µM)	Cp (µM)	Cp (µM)	Cp (µM)	Cp (µM)	Cp (µM)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	12,77	2,67	2,97	0,62	6,52	1,77
1	13,38	2,08	4,09	1,44	7,94	1,08
2	6,63	1,87	3,40	0,66	6,57	1,56
4	2,38	0,87	2,22	0,39	4,56	0,54
8	0,72	0,18	2,87	1,84	1,53	0,57
12	0,31	0,03	0,60	0,09	1,45	0,17
24	<LLOQ	<LLOQ	0,47	0,17	0,73	0,03
32	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	0,49	0,01
48	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	0,27	0,02

Figura 36

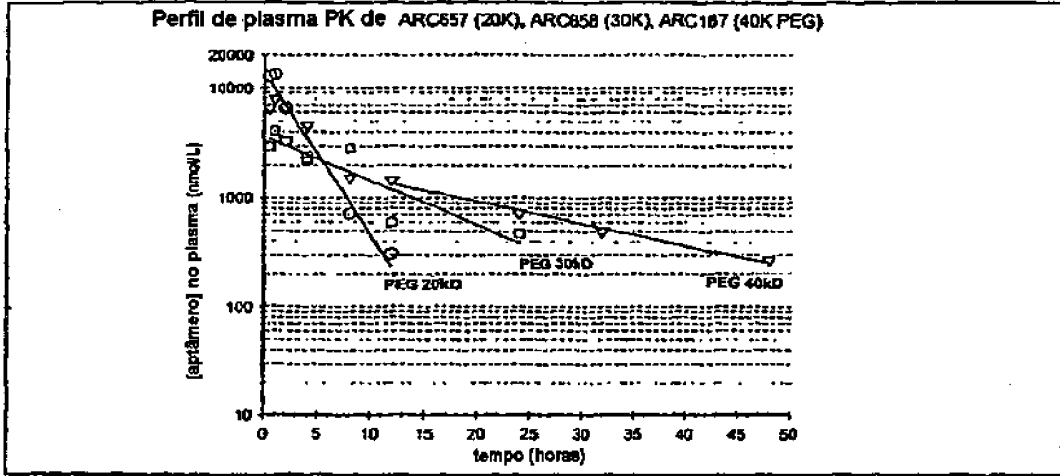


Figura 37

Espécie	Dose (mg/kg)	Via Admin.	Grupo PEG	C _{max} (µg/ml)	AUC _{0-∞} (µg·h/ml)	t _{1/2} (α) (h)	t _{1/2} (β) (h)	Cl (ml/min-kg)	V _{ss} (ml/kg)
rato	10	IV	20kD	169,97	458	-	2,05	0,36	65
rato	10	IV	30kD	52,00	497	-	7,40	0,34	220
rato	10	IV	40kD	100,85	886	-	15,00	0,19	188

Figura 38A

N° de grupo	N° de animais	Artigo de teste	Dose		Via da dose	Colheita de amostras
			(mg/kg)	(ml/kg)		
1	33F	ARC 187	10	4	IV	t = pré-dose, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72 horas
2	33F	ARC1905	10	4	IV	t = pré-dose, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72 horas

Figura 38B

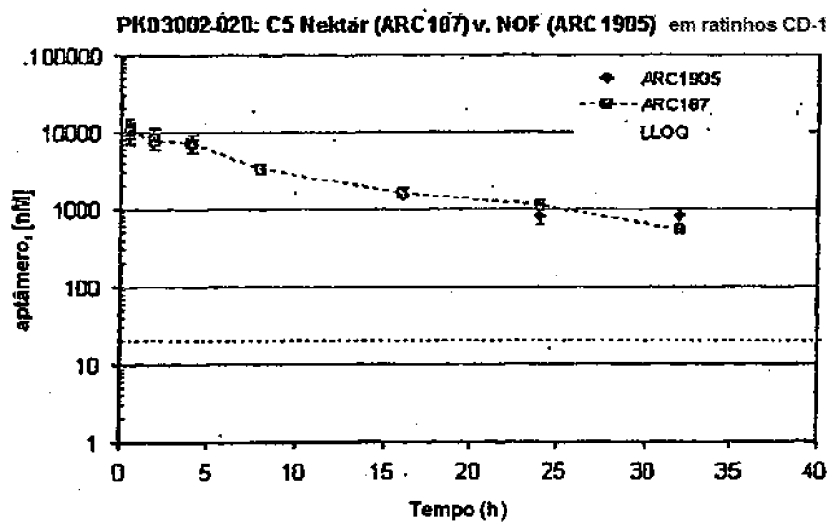


Figura 38C

Análise não compartimental (NCA) de PK			
Atributo	Unidade	ARC1905	ARC 187
C_{máx}	μM	12	10
ABC_{0,∞}	μM-h	88	89
MRT_{0,∞}	h	11	11
CL	ml/min-kg	0,15	0,15
V_{ss}	ml/kg	95	96
K₁₀	1/h	0,151	0,121
t_{1/2}(K₁₀)	h	5	6

Figura 39

Aptâmero	Antes	1 h	3 h	6 h
ARC657	Não	Sim	Sim	Sim
ARC658	Não	Sim	Sim	Sim
ARC187	Não	Sim	Sim	Sim

Figura 40

Número de grupo	Número de animais	Artigo de teste	Nível de dosagem (mg/kg)	Volume de dose (ml/kg)	Regime de dosagem	Colheita de amostras
1	1	ARC657 PEG de 20 kDa	30	3	Bólus intravenoso no Dia 1	t = pré-dose, 1, 5, 10, 15 e 30 minutos e a 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 192 horas
2	1	ARC658 PEG de 30 kDa	30	3	Bólus intravenoso no Dia 1	t = pré-dose, 1, 5, 10, 15 e 30 minutos e a 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 192 horas
3	1	ARC187 PEG de 40 kDa	30	3	Bólus intravenoso no Dia 1	t = pré-dose, 1, 5, 10, 15 e 30 minutos e a 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 192 horas

Figura 41

PK de Conjugados de Aptâmero Anti-C5-PEG em Macacos Cínomolgos			
Aptâmero	ARC657	ARC658	ARC187
Grupo de PEG	20 kDa	30 kDa	40 kDa
	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
Tempo (h)	Cp (μM)	Cp (μM)	Cp (μM)
0	0,00	0,00	0,00
0,08	16,41	21,99	18,00
0,25	16,64	22,67	17,26
0,5	19,38	26,16	24,17
1	19,36	27,08	21,79
4	7,73	14,16	21,69
8	2,03	6,02	16,68
12	1,10	3,04	13,11
24	0,36	0,95	7,24
48	0,15	0,42	2,30
72	0,07	0,25	0,96
96	0,03	0,23	0,54
192	0,01	0,04	0,14

Figura 42

Espécie	Dose (mg/kg)	Via Admin.	Grupo PEG	C _{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	AUC _{0-∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	t _{1/2} (α) (hr)	t _{1/2} (β) (h)	Cl (ml/min-kg)	V _{ss} (ml/kg)
primata	30	IV	20kD	293	1191	2,35	31,80	0,41	273
primata	30	IV	30kD	385	2484	3,33	40,08	0,20	233
primata	30	IV	40kD	316	6752	12,38	60,11	0,07	141

Figura 43

Figura 43a [sC5b-9] vs Tempo

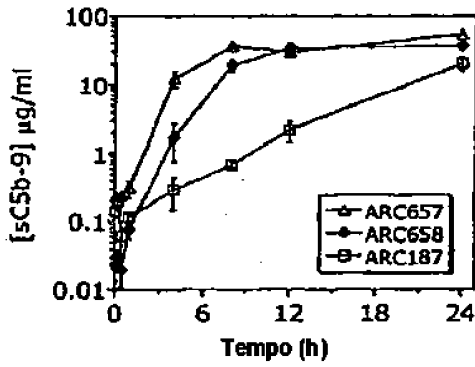


Figura 43b [sC5b-9] vs [aptâmero]

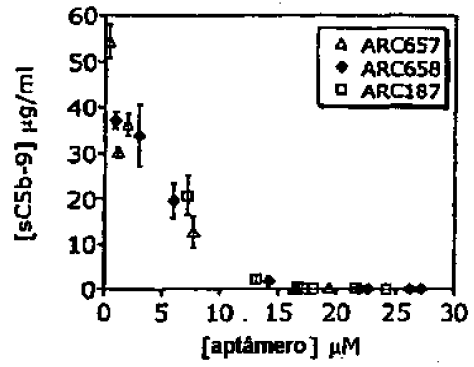


Figura 43c [C5a] vs Tempo

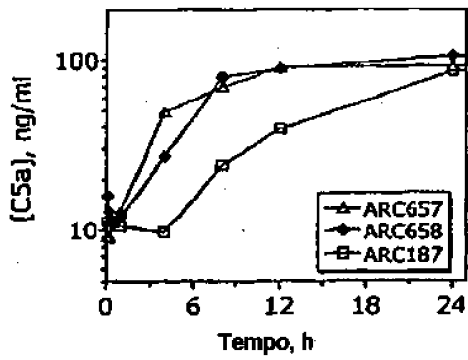


Figura 43d [C5a] vs [aptâmero]

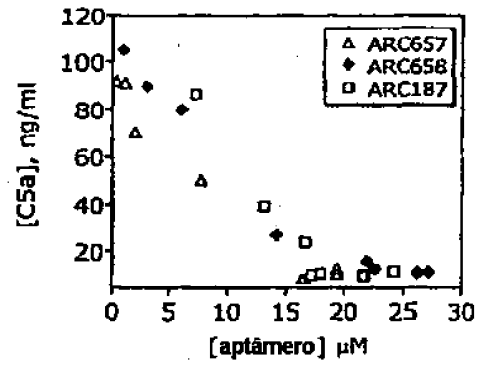


Figura 44

Número de grupo	Número de animais	Artigo de teste	Nível de dosagem (mg/kg)	Volume de dose (ml/kg)	Regime de dosagem	Colheita de amostras
1	4	ARC658 PEG de 30 kDa	30	3	Bolus intravenoso no dia I	t = antes da dose, 1, 5, 10, 15 e 30 minutos e em 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 192 horas
2	4	ARC187 PEG 40 kDa	30	3	Bolus intravenoso no dia I	t = antes da dose, 1, 5, 10, 15 e 30 minutos e em 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 192 horas

Figura 45

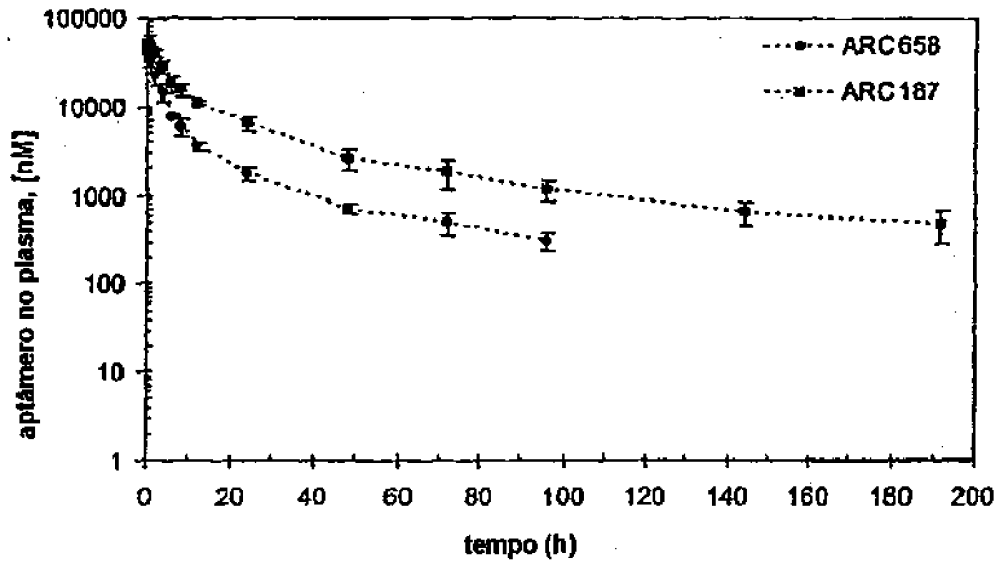


Figura 46

Espécie	Dose (mg/kg)	Via Admin.	Grupo PEG	C _{max} (μM)	AUC _{0-∞} (μg·h/ml)	t _{1/2} (α) (h)	t _{1/2} (β) (h)	Cl (ml/min-kg)	V _{ss} (ml/kg)
primata	30	IV	30kD	519	3059	2,35	30,45	0,16	213
primata	30	IV	40kD	609	8061	4,48	53,13	0,06	168

Figura 47

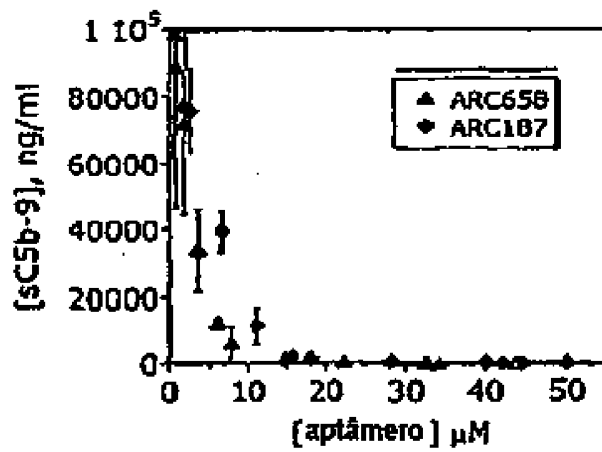


Figura 48

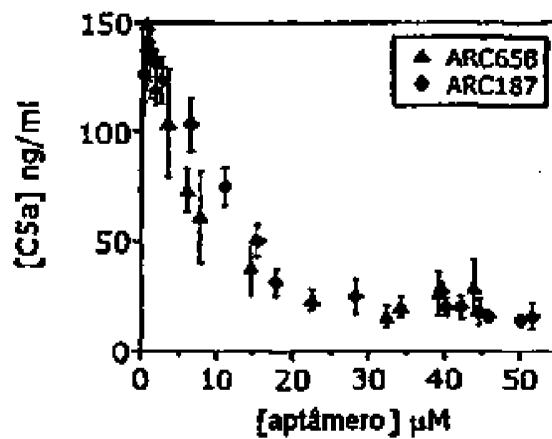


Figura 49

Gr. N.º	Número de animais	Artigo de teste	Nível de dosagem (mg/kg)	Concentração de dose (mg/l)	Volume de dose (ml/l)	Regime de dosagem	Último Dia de Teste
1	3	ARC187	1 mg/kg bolus IV e 0,0013 mg/kg/min infusão IV	10	0,1 ml/kg, bolus IV e 0,1872 ml/kg/dia, infusão IV	Bolus IV e infusão de 48 horas no Dia 1	Dia 8

Figura 50

Espécie	Dose (mg/kg)	Via Admin.	Grupo PEG	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	$t_{1/2}(\alpha)$ (h)	$t_{1/2}(\beta)$ (h)	Cl ($\text{ml/min}\cdot\text{kg}$)	V_{SS} (ml/kg)
primata	30	IV	40kD	610	8061	4,48	53,13	0,06	168

Figura 51

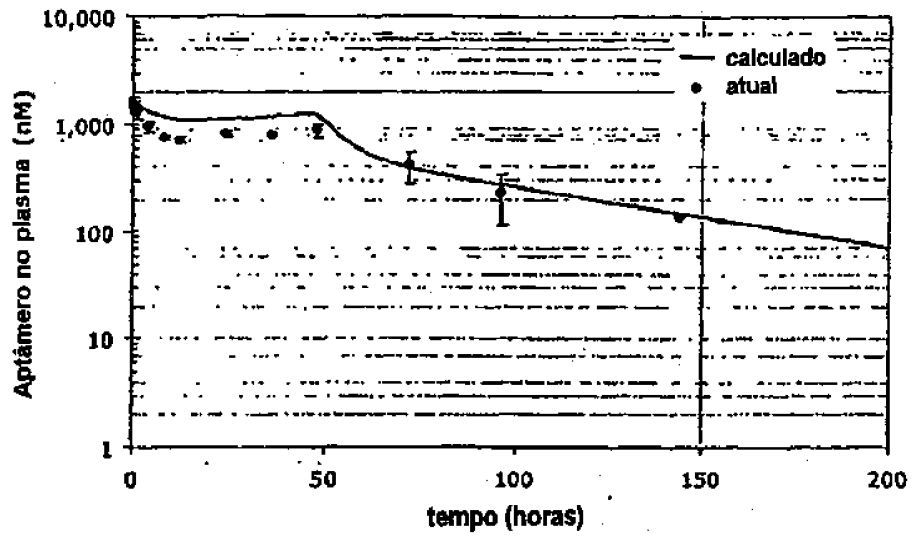


Figura 52

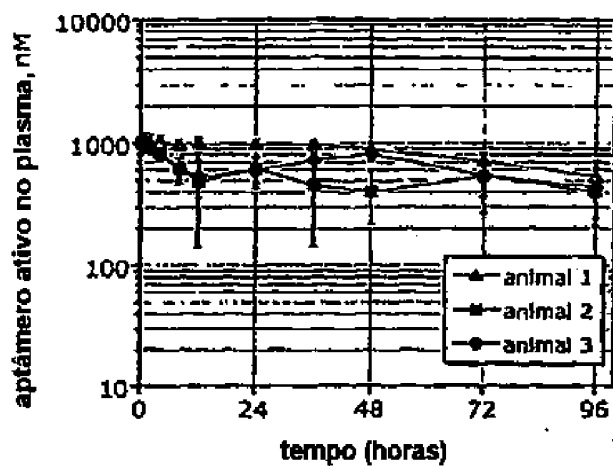


Figura 53

Aptâmero	Grupo PEG	M. Mol. (oligo)	M. Mol. (total)	$t_{1/2} (\alpha)$ (h)	$t_{1/2} (\beta)$ (h)	Dose Total (oligo) para 1,5 μ M (g)
ARC187	40 kDa	12,703	52,703	4,48	53,13	0,40

Figura 54

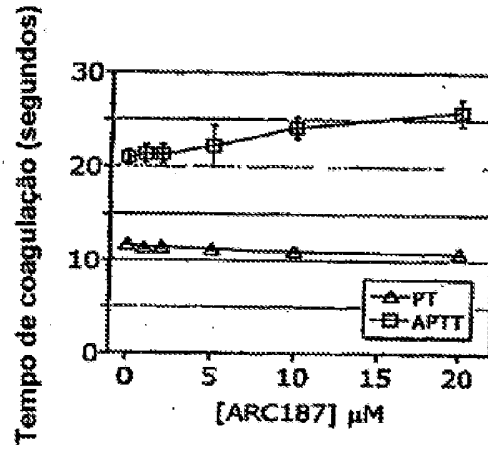


Figura 55

tratamento	ACT (segundos)		
	Dador 1 ^a	Dador 2 ^b	Dador 3 ^b
linha de base	133 ± 30	145 ± 12	138 ± 1
+ heparina	842 ± 95	519 ± 16	450 ± 15
+ heparina e ARC187	nd	618 ± 55	492 ± 28
+ heparina e protamina	160 ± 11	155 ± 6	159 ± 9
+ heparina, protamina e ARC187	200 ± 5	172 ± 1	169 ± 8

^a 5 U/ml de heparina; ^b 4 U/ml heparina; nd, não determinado

Figura 56

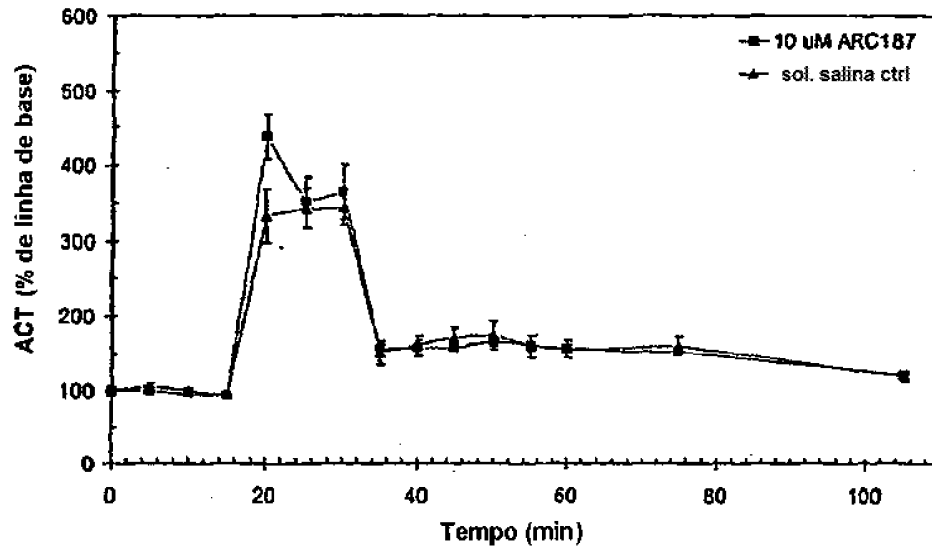


Figura 57

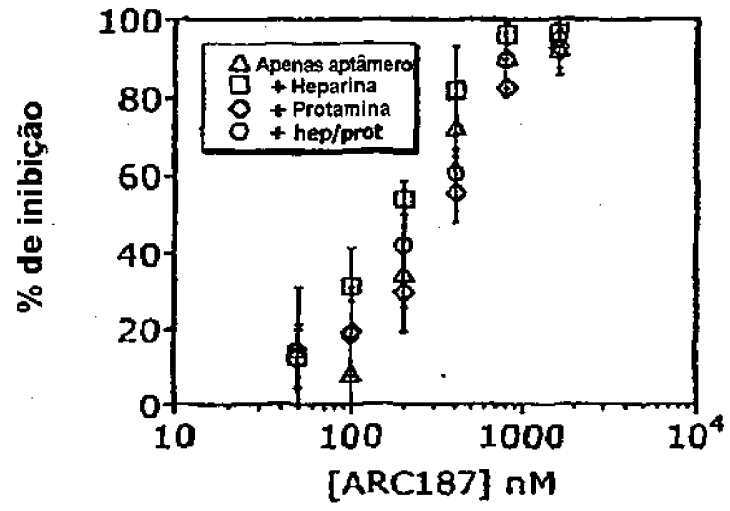


Figura 58

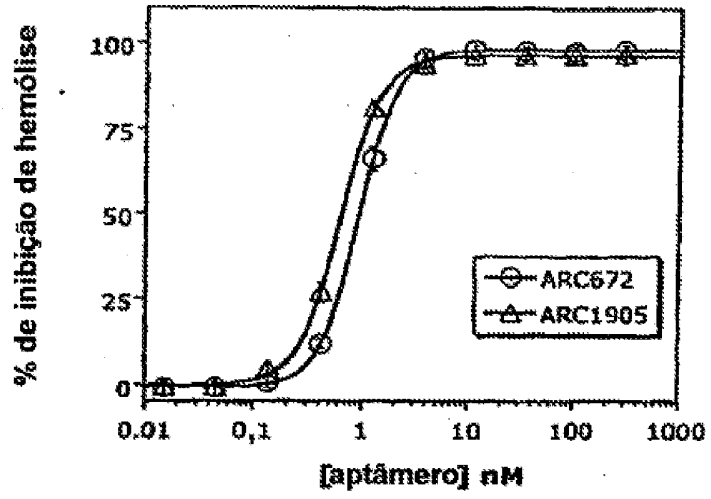


Figura 59A

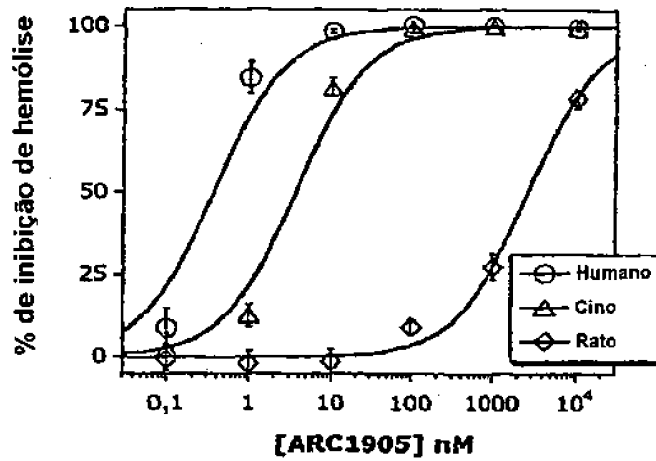


Figura 59B

Espécie de soro	ARC1905 CI ₅₀ (nM)	ARC127 CI ₅₀ (nM)
Humano	0,349 ±0,0898	>10.000 NA
CMacaco Cinomolgo	3,69 ±0,603	>10.000 NA
Rato	2700 ±470	~10.000 NA

Figura 60

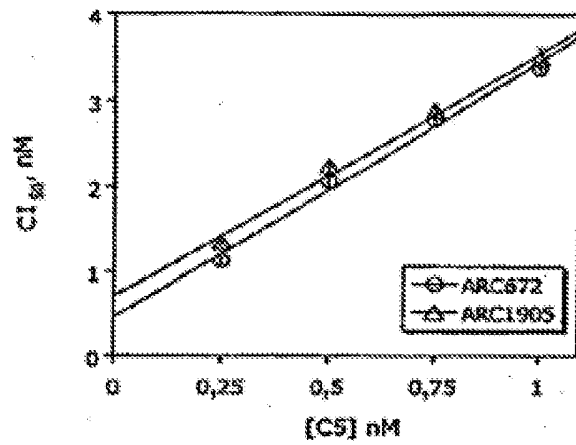


Figura 61

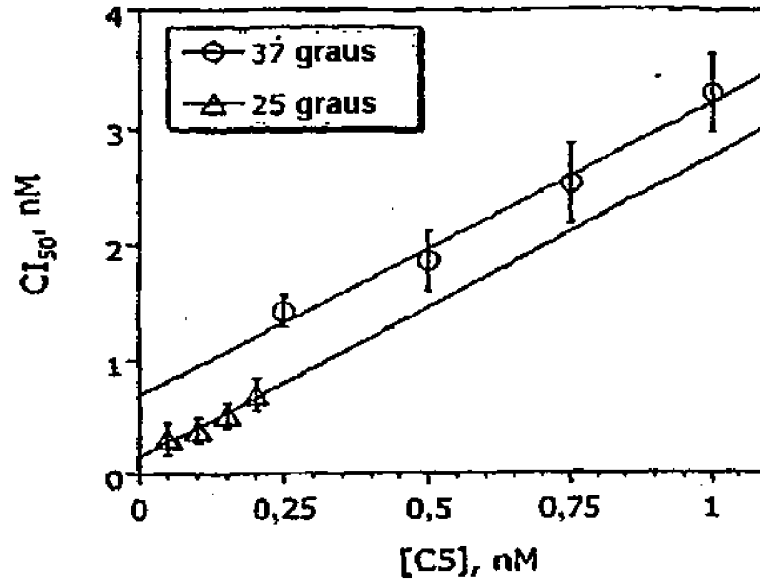


Figura 62

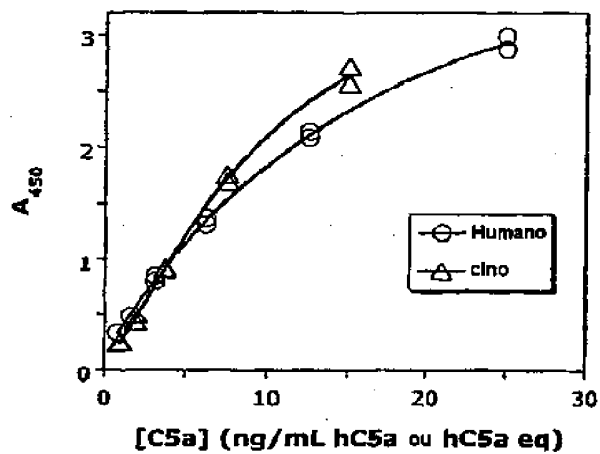


Figura 63

Aptâmero	CI ₅₀ (nM)	CI ₉₀ (nM)	CI ₉₉ (nM)
Humano	196 ±13,9	442 ±23,2	1090 ±198,0
Macaco Cinomolgo	536 ±54,7	1810 ±405,8	6900 ±2600
Razão cino/humano	2,73 ±0,339	4,1 ±0,94	6,4 ±2,65

Figura 64

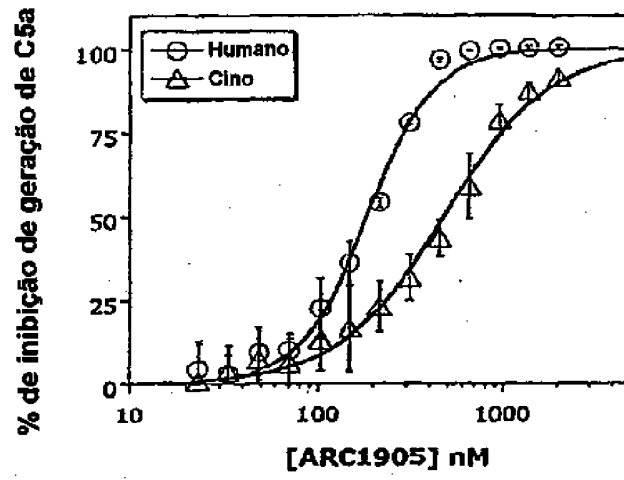


Figura 65

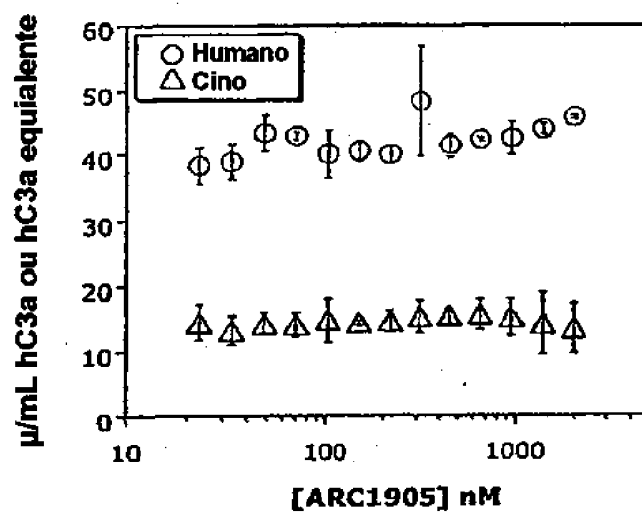


Figura 66

Dador	CI ₅₀ (nM)	CI ₉₀ (nM)	CI ₉₉ (nM)
Média de 5 dadores	119	268	694
DT	28,6	39,2	240,9

Figura 67

