

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 009**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2015 PCT/IL2015/000039**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16027263**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2015 E 15781152 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3194586**

54 Título: **Trombina estabilizada**

30 Prioridad:

21.08.2014 IL 23424614
21.08.2014 US 201462039989 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2021

73 Titular/es:

OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
Bldg.14 Weizmann Science Park, P.O. Box 619
Rehovot 7610601, IL

72 Inventor/es:

PILPEL, YAIR;
DORON, SIVAN;
ZHERDEV, YURI y
BYK-TENNENBAUM, TAMARA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 805 009 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Trombina estabilizada

5 **Listado de secuencias**

La aplicación instantánea contiene un Listado de Secuencias, que se envía concomitantemente con esta aplicación a través de EFS-Web en formato ASCII y se incorpora por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 11 de agosto de 2014, se denomina "Listado de Secuencias" y tiene un tamaño de 3 kilobytes.

10

Campo de la invención

En el presente documento se proporcionan compuestos, composiciones que comprenden los mismos y métodos útiles para estabilizar reversiblemente la actividad de la trombina y extender la vida útil de la trombina. En particular, se describen en el presente documento oligonucleótidos de unión a trombina reversibles capaces de interactuar con la trombina e inhibir la actividad de la trombina y un oligonucleótido antisentido a la misma, y las composiciones y métodos de uso, por lo tanto, para estabilizar la actividad de la trombina en una formulación de trombina líquida.

15

20 **Antecedentes**

La trombina es una proteasa de serina que sirve como componente activo en varios productos de hemostasia. P. ej., los selladores de fibrina comprenden típicamente un componente de fibrinógeno y un componente de trombina. Cuando ambos componentes se mezclan (p. ej., cuando se aplica a una herida sangrante o una incisión quirúrgica) la trombina corta el fibrinógeno y se forma un polímero de fibrina. La trombina concentrada purificada en forma líquida muestra una reducción en la actividad durante el almacenamiento prolongado, principalmente como resultado de la autólisis.

25

Las formulaciones hemostáticas que contienen trombina líquida tienen requisitos especiales de manipulación para mantener la actividad biológica de la trombina y prevenir la degradación autolítica. P. ej., la trombina líquida requiere congelación o la adición de inhibidores de proteasa para mantener la estabilidad de la vida útil. Las deficiencias de las soluciones líquidas de trombina en uso hoy en día son múltiples: en la clínica y en el quirófano, la congelación es costosa y no siempre factible, y los inhibidores promiscuos de la proteasa pueden afectar negativamente la actividad de la trombina y otras proteasas en la vía de la hemostasia una vez que el sellador de fibrina o se aplica la trombina.

30

35

Las preparaciones líquidas de trombina pueden convertirse en una preparación médica liofilizada, que se usa después de disolverse en el momento del uso. Sin embargo, las preparaciones líquidas son ventajosas en comparación con las preparaciones liofilizadas porque pueden administrarse fácilmente sin el paso adicional de disolverse en un disolvente antes de su uso. Además, el paso de liofilización es costoso y requiere mucho tiempo y puede resultar en una pérdida de rendimiento.

40

Las composiciones y métodos conocidos para estabilizar la trombina son insatisfactorios e incluyen lo siguiente: inclusión de varios componentes no específicos (p. ej., proteínas transportadoras a granel tales como albúminas, diferentes azúcares estabilizantes, inhibidores de proteasas generales, etc.); formulación de la trombina con inhibidores de la actividad de la trombina, que aunque pueden ser eficaces, también inactivan o inhiben la trombina, reduciendo así su efectividad; y formulación de una solución de baja concentración de trombina, lo que requiere la administración de grandes cantidades de la formulación.

45

Varias publicaciones se refieren a la estabilización de la trombina: p. ej., la publicación de solicitud de patente internacional nº WO2008157304; Patentes de los EE.UU. N^{os} 4.409.334; 7.351.561 y 8.394.372; Solicitud de Pat. de EE.UU. Nº 20080311104; y las patentes europeas N^{os} EP0277096 B1 y EP 0478827 B1. WO03002592 se refiere a un aptámero que comprende un oligonucleótido circular que define una a cuatro regiones de unión diana. Bompiani, K. M., et al., *J. Thromb. Haemost.*, **2012**, 10, 870-880, describe la estructura y función de un aptámero de ARN resistente a nucleasa de 2'F modificado (ARN_{R9D-14T}) que se une a protrombina/trombina y es un anticoagulante potente. Musumeci, D. et al., *Pharmacol. Therapeut.*, **2012**, 136, 202-215 proporciona una revisión de los aptámeros de unión de trombina. Müller, J. et al., *J. Thromb. Haemost.*, **2008**, 6, 2105-2012, caracteriza el perfil anticoagulante de HD1-22 en comparación a los inhibidores de trombina de actuación directa clínicamente establecidos.

50

55

Sigue habiendo una necesidad de compuestos específicos de trombina útiles para estabilizar la trombina de la degradación autolítica. Preferiblemente, los compuestos son inhibidores reversibles de trombina que pueden usarse con una formulación líquida concentrada de trombina.

60

Sumario de la invención

65

En este documento se proporciona un método para el uso de oligonucleótidos de unión a trombina que tienen

la capacidad excepcional de inhibir reversiblemente la trombina y estabilizar su actividad en una solución acuosa.

Los oligonucleótidos de unión a trombina son tales que pueden unirse a la trombina en una solución acuosa de trombina e inhibir, al menos parcialmente, la actividad de la trombina. Esta inhibición de la actividad de trombina por el oligonucleótido de unión a trombina puede revertirse poniendo en contacto la solución de trombina que comprende el oligonucleótido de unión a trombina con un oligonucleótido antisentido. Por lo tanto, una solución acuosa de trombina se puede estabilizar poniéndola en contacto con el oligonucleótido de unión a trombina en ausencia del oligonucleótido antisentido. Cuando se desea el uso de trombina, la actividad de la trombina se puede restaurar poniendo en contacto la solución de trombina estabilizada con el oligonucleótido antisentido. La reversibilidad de la unión del oligonucleótido de unión a trombina a la trombina mediante la adición de un oligonucleótido antisentido proporciona una ventaja inequívoca en la clínica y evita la necesidad de congelar y descongelar una solución de trombina líquida o reconstituir un componente de trombina liofilizada antes de su uso.

Los presentes inventores han demostrado por primera vez que los oligonucleótidos de unión a trombina son capaces de inhibir y estabilizar reversiblemente la actividad de la trombina líquida y que tales moléculas son útiles para extender la vida útil de la trombina.

Sin desear limitarse a la teoría, las moléculas de unión a trombina se unen a la trombina para inhibir, total o parcialmente, la autólisis de la trombina. Una vez que el oligonucleótido de unión a trombina unido a la trombina entra en contacto con un oligonucleótido antisentido, la trombina se libera de la inhibición y es capaz de escindir sus sustratos heterólogos, incluido el fibrinógeno. Los métodos son más beneficiosos ya que se llevan a cabo fácilmente en la clínica.

En un aspecto, se proporciona aquí un método para estabilizar la actividad de trombina en una solución (p. ej., solución acuosa), el método incluye inhibir la actividad de trombina poniendo en contacto la trombina con un oligonucleótido de unión a trombina, en donde el oligonucleótido de unión a trombina es capaz de unirse a un segundo oligonucleótido; y en donde la inhibición de la actividad de la trombina se puede revertir poniendo en contacto el oligonucleótido de unión a la trombina con el segundo oligonucleótido. En algunas realizaciones, el segundo oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido para el oligonucleótido de unión a trombina.

En un aspecto, se proporciona aquí un método para estabilizar la actividad de trombina en una solución, el método incluye inhibir la actividad de trombina poniendo en contacto la trombina con un oligonucleótido de unión a trombina, en donde el oligonucleótido de unión a trombina es capaz de unirse a un oligonucleótido antisentido; y en donde la inhibición de la actividad de la trombina se puede revertir poniendo en contacto el oligonucleótido de unión a trombina unido a la trombina con el oligonucleótido antisentido.

La solución comprende una concentración de trombina igual o superior a 4 UI/ml y hasta 15.000 UI/ml de trombina. En algunas realizaciones, la concentración de trombina en solución es 10 UI/ml-1.000 UI/ml; 20 UI/ml-15.000 UI/ml; 100 UI/ml-5.000 UI/ml; 200 UI/ml-1000 UI/ml o 300 UI/ml-100 UI/ml.

El oligonucleótido de unión a trombina se selecciona para unirse a cualquier región de la trombina a la que la unión inhibiría la actividad de la trombina de manera reversible; por ejemplo para inhibir la actividad de trombina de la autólisis. En algunas realizaciones, el oligonucleótido de unión a trombina se une al exosito I o al exosito II de trombina o a ambos. En realizaciones específicas del método, el oligonucleótido de unión a trombina se une al exosito I. En algunas realizaciones, el oligonucleótido de unión a trombina es un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos de ADN y/o ARN de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, o aproximadamente 12 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, aproximadamente 14 a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud, o aproximadamente 14 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El aptámero puede unirse a una secuencia lineal consecutiva de aminoácidos en trombina o puede unirse a una región tridimensional de trombina. En algunas realizaciones, el aptámero de unión a trombina es un oligonucleótido de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 1 5' GGTGGTGTGGTTGG 3', una variante de SEQ ID NO: 1 que comprende una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 2 5' GGGTTGGGTGTGGGTTGGG 3' o un oligonucleótido de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3 5' AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT 3'. En realizaciones específicas, la secuencia de nucleótidos del aptámero de unión a trombina se expone en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos del aptámero de unión a trombina se expone en SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos del aptámero de unión a trombina se expone en SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el aptámero de unión a trombina es un oligonucleótido de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 5' GGUUGGUGUGGUUGG 3', una variante de SEQ ID NO: 4 que comprende una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 5 5' GGGUUGGGUGUGGGUUGGG 3' o un oligonucleótido de ARN que comprende una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 6 5' AGUCCGUGGUAGGGCAGGUUGGGGUGACU 3'.

El oligonucleótido antisentido se selecciona para unirse al oligonucleótido de unión a trombina. El oligonucleótido antisentido incluye una secuencia de nucleótidos que se une al oligonucleótido de unión a trombina y

puede unirse a una secuencia lineal consecutiva o a una estructura tridimensional del oligonucleótido de unión a trombina. En algunas realizaciones del método, el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de nucleótidos de ADN y/o ARN de aproximadamente 8 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, o aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, aproximadamente 12 a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud, o aproximadamente 12 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El oligonucleótido antisentido puede unirse a parte o al oligonucleótido de unión a trombina completo. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 7 5' CCAACCACACCAACC 3', SEQ ID NO: 8 5' CCAACCCACACCCAACCC, o SEQ ID NO: 9 5' AGTCACCCCAACCTGCCCTACCACGGACT 3'. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de ARN que tiene una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 10 5' CCAACCACACCAACC 3', SEQ ID NO: 11 5' CCAACCCACACCCAACCC 3' o SEQ ID NO: 12 5' AGUCACCCCAACCUGCCCUACCACGGACU 3'.

Un oligonucleótido antisentido puede estar unido covalentemente o no covalentemente o asociado con una molécula que puede incluir uno o más de un resto nucleótido o no nucleótido, *p. ej.*, un nucleótido, un análogo de nucleótido, un aminoácido, un péptido, un polipéptido, un resto lipídico, un resto carbohidrato, un marcador, una matriz, perlas o una etiqueta, directamente o usando un enlazador. En algunas realizaciones del método, la solución comprende una relación molar de menos de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:1 de oligonucleótido de unión a trombina: trombina. En algunas realizaciones, la proporción del oligonucleótido de unión a trombina: trombina en la solución es de aproximadamente 9:1, o aproximadamente 8:1, o aproximadamente 7:1, o aproximadamente 6:1, o aproximadamente 5:1, o aproximadamente 4:1, o aproximadamente 3,5:1, o aproximadamente 3:1, o aproximadamente 2,5:1; o aproximadamente 2:1 o aproximadamente 1:1.

En algunas realizaciones del método, la constante de disociación (Kd) entre el oligonucleótido de unión a trombina y el oligonucleótido antisentido en solución es igual o menor que 0,2 μM (microM).

En otro aspecto, se proporciona aquí una formulación de trombina para usar en aplicaciones que requieren la conversión de fibrinógeno a fibrina, la formulación comprende: trombina y un oligonucleótido de unión a trombina, en donde el oligonucleótido de unión a trombina inhibe la actividad de trombina y es capaz de unirse a un oligonucleótido antisentido y en donde la inhibición de la actividad de la trombina puede revertirse poniendo en contacto la formulación con el oligonucleótido antisentido.

La trombina está presente en la formulación a una concentración igual o superior a 4 UI/ml y hasta 15.000 UI/ml de trombina. En algunas realizaciones, la concentración de trombina en solución es 10 UI/ml-1.000 UI/ml; 20 UI/ml-15.000 UI/ml; 100 UI/ml-5.000 UI/ml; 200 UI/ml-1000 UI/ml o 300 UI/ml- 1000 UI/ml.

El oligonucleótido de unión a trombina se selecciona para unirse a cualquier región de la trombina a la que la unión inhibiría y estabilizaría reversiblemente la actividad de la trombina; *p. ej.*, inhibe total o parcialmente la actividad de trombina de la autólisis. En algunas realizaciones de la formulación, el oligonucleótido de unión a trombina se une al exosito I o al exosito II de trombina. En realizaciones específicas, el oligonucleótido de unión a trombina se une al exosito I. En algunas realizaciones, el oligonucleótido de unión a trombina es un aptámero que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en cualquiera de SEQ ID NOS:1-6. En una realización, el oligonucleótido de unión a trombina es un aptámero que comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones de la formulación, el oligonucleótido de unión a trombina y la trombina están presentes en una relación molar de menos de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:1 de oligonucleótido de unión a trombina: trombina. En algunas realizaciones, la proporción del oligonucleótido de unión a trombina: trombina en la formulación es aproximadamente 9:1, o aproximadamente 8:1, o aproximadamente 7:1, o aproximadamente 6:1, o aproximadamente 5:1, o aproximadamente 4:1, o aproximadamente 3,5:1, o aproximadamente 3:1, o aproximadamente 2,5:1; o aproximadamente 2:1 o aproximadamente 1:1.

En algunas realizaciones de la formulación, la constante de disociación (Kd) entre el oligonucleótido de unión a trombina y el oligonucleótido antisentido en solución es igual o menor que 0,2 μM (microM).

En otro aspecto más, se proporciona aquí un kit que comprende un recipiente que comprende trombina y un oligonucleótido de unión a trombina; un recipiente que comprende un oligonucleótido antisentido al oligonucleótido de unión a trombina; y opcionalmente instrucciones de uso.

Los contenedores pueden ser una pieza monolítica que incluye al menos dos cámaras separadas por un tabique.

En una realización, las cámaras están divididas por un tabique, que es al menos parcialmente rompible, el frenado del tabique permite mezclar la trombina inhibida por oligonucleótidos y el oligonucleótido antisentido.

En algunas realizaciones, el contenedor y/o las cámaras son flexibles y se puede romper el tabique aplicando presión (*p. ej.*, presión manual) sobre el contenedor y/o las cámaras.

El tamaño de cada cámara y los volúmenes de llenado dependen, *p. ej.*, del uso pretendido, las relaciones de concentración adecuadas entre los oligonucleótidos antisentido y el oligonucleótido de unión a trombina, y/o el volumen deseado.

El contenedor y/o la cámara pueden comprender una abertura, *p. ej.*, que incluye Luer Lock macho o hembra. La apertura puede ser resellable.

El oligonucleótido antisentido puede estar en forma de polvo o líquido. El kit puede contener un líquido para la reconstitución.

El kit puede comprender una jeringa precargada de múltiples cámaras, *p. ej.*, una cámara que contiene trombina y un oligonucleótido de unión a trombina y la otra cámara que contiene un oligonucleótido antisentido, *p. ej.*, una cámara doble como se describe en la publicación de patente PCT nº WO 97/46202A1.

En algunas realizaciones del kit, el oligonucleótido de unión a trombina es capaz de unir el oligonucleótido antisentido y la unión del oligonucleótido de unión a trombina y la trombina se invierte poniendo en contacto el oligonucleótido de unión a trombina con el oligonucleótido antisentido. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido está en solución. En realizaciones alternativas, el oligonucleótido antisentido es fase sólida o está unido a una fase sólida. El kit puede comprender además un recipiente que comprende fibrinógeno. En diversas realizaciones del kit, el oligonucleótido antisentido se excluye del componente fibrinógeno.

En algunas realizaciones del kit, el oligonucleótido de unión a trombina y la trombina están presentes en una relación molar de menos de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:1 de oligonucleótido de unión a trombina de unión a trombina. En algunas realizaciones, la proporción del oligonucleótido de unión a trombina: trombina en la formulación es aproximadamente 9:1, o aproximadamente 8:1, o aproximadamente 7:1, o aproximadamente 6:1, o aproximadamente 5:1, o aproximadamente 4:1, o aproximadamente 3,5:1, o aproximadamente 3:1, o aproximadamente 2,5:1; o aproximadamente 2:1 o aproximadamente 1:1.

En una realización, los contenedores son contenedores sellados que tienen una etiqueta fijada a una superficie exterior de los mismos. En algunas realizaciones, la formulación se prepara para usar como un componente sellador de fibrina. El kit puede comprender además uno o más dispositivos para la administración del oligonucleótido de unión trombina-trombina; oligonucleótido antisentido y/o los componentes de fibrinógeno.

En otro aspecto, se proporciona un método para convertir fibrinógeno en fibrina que comprende: mezclar una formulación que comprende: trombina y un oligonucleótido de unión a trombina, en donde el oligonucleótido de unión a trombina es capaz de inhibir la actividad de la trombina y de unir un oligonucleótido antisentido, y en donde la inhibición de la actividad de la trombina se invierte mediante la adición del oligonucleótido antisentido; el oligonucleótido antisentido y el fibrinógeno.

En algunas realizaciones del método, la relación entre el oligonucleótido antisentido y el oligonucleótido de unión a trombina está en el intervalo de aproximadamente 1:1 a 2:1.

En algunas realizaciones del método, el oligonucleótido de unión a trombina y la trombina están presentes en una relación molar de menos de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:1 de oligonucleótido de unión a trombina: trombina. En algunas realizaciones, la proporción del oligonucleótido de unión a trombina: trombina en la formulación es aproximadamente 9:1, o aproximadamente 8:1, o aproximadamente 7:1, o aproximadamente 6:1, o aproximadamente 5:1, o aproximadamente 4:1, o aproximadamente 3,5:1, o aproximadamente 3:1, o aproximadamente 2,5:1; o aproximadamente 2:1 o aproximadamente 1:1. El componente fibrinógeno puede prepararse como se describe en la técnica, *p. ej.*, en la publicación de patente PCT nº WO 93/05822 o como en el kit de fibrina descrito en la farmacopea europea. En algunas realizaciones, el componente de fibrinógeno está libre de plasmína (ogen) o está empobrecido como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 7641918 o en la Publicación de Patente PCT Nº WO 02/095019.

En algunas realizaciones del método, la secuencia de ácido nucleico del oligonucleótido de unión a trombina se establece en cualquiera de SEQ ID NOS: 1-6, preferiblemente SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto más, se proporciona aquí un oligonucleótido antisentido de un oligonucleótido de unión a trombina para usar en la inversión de una unión entre el oligonucleótido de unión a trombina y la trombina en aplicaciones que requieren convertir fibrinógeno en fibrina.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido comprende cualquiera de SEQ ID NOS: 7-12. Además se proporciona una composición que comprende el oligonucleótido antisentido descrito en este documento; y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un método para seleccionar oligonucleótidos

capaces de unirse y estabilizar reversiblemente la actividad de trombina y de unirse a un oligonucleótido antisentido. Por consiguiente, se proporciona un método para seleccionar un oligonucleótido capaz de unirse y estabilizar reversiblemente la actividad de trombina en una formulación de trombina líquida acuosa, que comprende

- 5 a. poner en contacto la trombina o un fragmento de la misma, cada uno de los cuales exhibe una actividad inicial de 4 a 15.000 UI/ml, con un conjunto de oligonucleótidos de unión a la trombina de prueba; e identificar uno o más oligonucleótidos de unión a trombina que inhiben, al menos parcialmente, la actividad inicial; y
- b. poner en contacto el oligonucleótido unido a trombina del Paso A) con un conjunto de oligonucleótidos antisentido de prueba;

10 por lo cual la restauración de al menos 4 UI/ml de actividad de trombina después del paso (b) indica 1) un oligonucleótido de unión a trombina potencial para la estabilización de la trombina y 2) un oligonucleótido antisentido potencial para revertir el efecto inhibitor del oligonucleótido de unión a trombina.

15 En algunas realizaciones del método de detección, la trombina tiene una actividad inicial de 4 a 15.000 UI/ml, aproximadamente 20 UI/ml a 15.000 UI/ml, o 100 UI/ml a 5.000 UI/ml, 200 UI/ml a aproximadamente 1000 UI/ml o aproximadamente 300 UI/ml a aproximadamente 1000 UI/ml.

20 En algunas realizaciones, el método proporciona un oligonucleótido antisentido que restaura la actividad de la trombina a al menos 4 UI/ml, al menos aproximadamente 20 UI/ml, al menos aproximadamente 100 UI/ml o al menos aproximadamente 300 UI/ml, al menos aproximadamente 1000 UI/ml y hasta 1500 UI/ml de la actividad inicial de trombina. Como alternativa, se proporciona un método para seleccionar un oligonucleótido capaz de unirse y estabilizar reversiblemente la actividad de la trombina en una formulación acuosa de trombina líquida, que comprende

- 25 a. poner en contacto la trombina o un fragmento de la misma, cada uno exhibiendo una actividad inicial, con un conjunto de oligonucleótidos de unión a la trombina de prueba; e identificar uno o más oligonucleótidos de unión a trombina que inhiben, al menos el 60% de la actividad inicial; y

- 30 b. poner en contacto un oligonucleótido unido a trombina del Paso A) con un conjunto de oligonucleótidos antisentido de prueba;

por lo cual la restauración de más del 40% de la actividad inicial después del paso (b) indica 1) un oligonucleótido de unión a trombina potencial para la estabilización de la trombina y 2) un oligonucleótido antisentido potencial para revertir el efecto inhibitor del oligonucleótido de unión a trombina.

35 En algunas realizaciones, el método proporciona actividad estabilizadora de trombina y restaura al menos 40%, 50% y hasta 100% de la actividad inicial de trombina.

40 En otro aspecto, en este documento se proporciona un oligonucleótido antisentido de un oligonucleótido de unión a trombina para usar en la inversión de la inhibición de la trombina por el oligonucleótido de unión a trombina en aplicaciones que requieren convertir fibrinógeno en fibrina.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido está unido a una fase sólida.

45 En otro aspecto, aquí se proporciona un método para revertir una trombina inhibida por oligonucleótidos, el método comprende los pasos de poner en contacto la trombina inhibida por oligonucleótidos con un antisentido para el oligonucleótido. En una realización, el antisentido para el oligonucleótido se inmoviliza en una fase sólida.

50 En algunas realizaciones, el antisentido está unido a la fase sólida directa o indirectamente.

En algunas realizaciones, la fase sólida se selecciona del grupo que consiste en perlas y filtros de medios cromatográficos.

55 En todos los aspectos de la presente, los oligonucleótidos de unión a trombina no se usan como anticoagulantes.

En otro aspecto, la invención se refiere a un aplicador de suministro que comprende:

- 60 un barril que contiene un oligonucleótido inhibió la trombina; y
un recipiente que tiene una abertura de suministro y que contiene un oligonucleótido antisentido unido a una fase sólida;

65 en donde el barril y el recipiente son capaces de estar en comunicación fluida, de modo que después de la comunicación fluida y el contacto de la trombina inhibida con la fase sólida, la actividad de la trombina aumenta antes de administrar la trombina a través de la abertura de administración. En algunas realizaciones, la comunicación fluida es a través de una abertura resellable colocada entre el barril y el recipiente.

En algunas realizaciones, el aplicador de suministro comprende además un barril que tiene una abertura de suministro y mantiene fibrinógeno.

En otro aspecto, la invención se refiere a un aplicador de suministro que comprende:

5 un barril que contiene un oligonucleótido inhibió la trombina; y un recipiente que tiene una abertura de suministro y que contiene un oligonucleótido antisentido; en donde el barril y el recipiente son capaces de estar en comunicación fluida, de modo que después de la comunicación fluida y el contacto de la trombina inhibida con el antisentido, la actividad de la trombina aumenta antes de administrar la trombina a través de la abertura de administración.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un aplicador de suministro que comprende:

15 un barril que contiene un oligonucleótido inhibió la trombina; y un oligonucleótido antisentido, en donde el oligonucleótido inhibe la trombina y el oligonucleótido antisentido se mantienen en cámaras separadas que pueden estar en comunicación fluida, de modo que permitir la comunicación fluida entre las cámaras y el contacto entre la trombina inhibida y el antisentido da como resultado una mayor actividad de la trombina antes del parto, y en donde el barril tiene una abertura para el suministro a través de la trombina.

En otro aspecto, la invención se refiere a un aplicador de suministro que comprende:

20 Un recipiente que contiene un oligonucleótido inhibió la trombina; y un oligonucleótido antisentido unido a una fase sólida, en donde el oligonucleótido inhibe la trombina y el oligonucleótido antisentido se mantienen en cámaras separadas que pueden estar en comunicación fluida, de modo que la comunicación fluida entre las cámaras y el contacto entre la trombina inhibida y la fase sólida da como resultado una mayor actividad de trombina antes del suministro, y en donde el recipiente tiene una abertura resellable para el suministro a través de la trombina.

25 La abertura resellable es una abertura sellada por, *p. ej.*, una membrana, tapa, aguja, tapa de goma, stent, tubo de suministro y/o punta.

En una realización, una abertura resellable evita o minimiza la fuga de líquido.

En algunas realizaciones, el aplicador de suministro comprende además un recipiente que tiene una abertura de suministro y que contiene fibrinógeno.

30 En algunas realizaciones, la trombina inhibida, el fibrinógeno y/o las formulaciones pueden estar en forma sólida, seca, acuosa y/o congelada. La fase sólida puede estar seca o suspendida en líquido, *p. ej.*, tampones.

En algunas realizaciones, los kits, dispositivo, recipientes, cámaras, recipiente, aplicación de suministro, barril y/o jeringa, etc. pueden comprender un líquido acuoso para la reconstitución.

35 Una trombina inhibida por oligonucleótidos es una trombina combinada con un oligonucleótido, dicho oligonucleótido puede unirse a la trombina en una solución acuosa de trombina y el oligonucleótido inhibe la actividad de la trombina, al menos parcialmente.

40 Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se harán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y las figuras.

Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1 es un gráfico que muestra que el oligonucleótido antisentido (AS) contrarresta efectivamente la inhibición de la trombina por TBA1 (aptámero de unión a trombina 1). Específicamente, el TBA1 inhibe la trombina/ml (~ 0,1µM) trombina de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento antisentido equimolar restablece por completo la actividad (medida por un ensayo de coagulación).

50 Las Figuras 2A-2D son gráficos que representan la estabilización de la trombina por TBA1, a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas. Se añadió TBA1 a la trombina (~1000 UI/ml) a las concentraciones indicadas y se incubó a TA durante hasta 90 días (2A) a 37°C durante hasta 14 días (2B) o a 2-8°C durante hasta 180 días (2C). La unión de TBA1 se invirtió con una concentración equimolar de oligonucleótido antisentido, y se diluyó 100 veces para probar la actividad de la trombina restante probada usando el ensayo de coagulación. (2D): las actividades restantes de trombina después de la incubación a 37°C durante 7 días en presencia de diferentes concentraciones de TBA1 como en la Figura 2B se representan frente a las concentraciones de TBA1 (µM).

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra una elasticidad similar de un coágulo de control y un coágulo formado en presencia de 25 µM de TBA1 + 25 µM de oligonucleótido antisentido.

60 Las Figuras 4A y 4B son gráficos que muestran que TBA1 no se puede revertir completamente con antisentido dentro del tiempo requerido para que la trombina coagule una solución de fibrinógeno. Figura 4A: TBA1 se neutraliza con cantidades crecientes de oligonucleótidos antisentido y actividad de trombina probada en un ensayo de actividad de trombina. El aumento de la relación antisentido: TBA1 por encima de 1:1 da como resultado una recuperación creciente de la actividad de la trombina, pero no se puede alcanzar una recuperación del 100%. Figura 4B: TBA1 se neutraliza con hasta 40 µM antisentido (relaciones antisentido:TBA1= 1-4) en los mismos picos de configuración al 60% de recuperación de la actividad de la trombina, según lo medido por el ensayo de actividad de la trombina. En

ambos experimentos, la actividad de la trombina se probó inmediatamente después de la adición del oligonucleótido antisentido y la mezcla.

5 La Figura 5 es un gráfico que muestra la inversión dependiente del tiempo de la inhibición mediada por TBA de 25 μM con oligonucleótidos antisentido, con una baja concentración de trombina ($\sim 0,1 \mu\text{M}$). La inhibición de TBA con un gran exceso molar sobre la trombina (250:1) no se neutraliza eficazmente con el oligonucleótido antisentido incluso después de 30 minutos.

10 La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra la validez de la neutralización rápida de TBA1 con oligonucleótidos antisentido a relaciones molares optimizadas en una prueba de caída. El control se realizó sin TBA1 u oligonucleótidos antisentido. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando diferentes proporciones de TBA1:antisentido, cuando el antisentido se añadió en compartimentos separados o se añadió antisentido directamente al componente de trombina que contiene TBA a dos concentraciones.

15 La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra que la cinética de neutralización del aptámero de 25 μM por oligonucleótidos antisentido es efectiva para su uso en un entorno de sellador de fibrina clásico (1000 UI/ml de solución de trombina). Una prueba de caída modificada muestra que una preincubación de dos minutos de trombina/TBA1 (25 μM) con oligonucleótidos antisentido equimolar es suficiente para reducir la inhibición a niveles no significativos de trombina (1000 UI/ml).

20 La Figura 8 muestra que el TBA1 agregado al componente de trombina en un sellador de fibrina de dos componentes se puede revertir eficientemente con oligonucleótidos antisentido agregados al componente de trombina/TBA en un entorno *in vivo*. Los resultados del modelo de hemostasia renal de rata muestran una actividad hemostática comparable para la trombina (control) y la trombina neutralizada con antisentido inhibida por TBA1 (prueba). Se usaron 25 μM de TBA1 y antisentido. Se añadió una cantidad equimolar de oligonucleótido antisentido a la trombina justo antes del ensamblaje del dispositivo EVICEL® (equipado con una extensión de punta de pulverización para la aplicación). La concentración de trombina es de 1000 UI/ml. Símbolos completos: valor promedio, símbolos abiertos: resultados para ratas individuales.

30 La Figura 9A muestra la inhibición de la trombina mediada por TBA1 y la inhibición de la inversión mediada por un oligonucleótido antisentido (AS) unido a biotina o perlas de biotina-estreptavidina. Se agregaron cantidades crecientes de TBA1 a $\sim 0,1 \mu\text{M}$ (10 UI/ml) de trombina y la actividad de la trombina se inhibió de una manera dependiente de la dosis (diamantes). La adición de oligonucleótidos antisentido biotinilados en cantidades equimolares/concentración igual a TBA1 restableció la actividad de la trombina hasta $\sim 40\%$ de la actividad inicial (cuadrados). La adición de oligonucleótidos antisentido biotinilados preincubados con Sefarosa-Estreptavidina a las mismas concentraciones dio como resultado una restauración de la actividad de la trombina similar a la de TBA1 biotinilado solo. Además, la adición de perlas biotiniladas solas a la concentración más alta no inhibió la actividad de la trombina (no se muestra).

40 En la Figura 9A, el oligonucleótido antisentido biotinilado o el oligonucleótido antisentido biotinilado preincubado con Sefarosa-Estreptavidina se añadió a la reacción al menos 15 minutos antes de la prueba de actividad de trombina, dando así suficiente tiempo para la interacción TBA1/oligonucleótido antisentido biotinilado, en la Figura 9B se analizó el tiempo necesario para la restauración máxima de la actividad de la trombina: se añadió oligonucleótido antisentido biotinilado preincubado con Sefarosa-Estreptavidina en los puntos de tiempo indicados antes de las pruebas de actividad de la trombina. Los resultados muestran que las concentraciones más altas de TBA1 necesitan más tiempo para revertir la inhibición de la trombina por AS biotinilado que las concentraciones más bajas de TBA1 con la concentración correspondiente de AS biotinilado.

50 Descripción detallada de la invención

La presente descripción se basa en parte en el hallazgo de que los oligonucleótidos de unión a trombina desarrollados para tratar trastornos de coagulación son capaces de inhibir y estabilizar reversiblemente la actividad de trombina en una formulación de trombina líquida.

55 Los términos "actividad de trombina estabilizadora reversiblemente" y "trombina de estabilización reversible" se refieren a reducir o prevenir, en parte o en su totalidad, la actividad autolítica de trombina de una manera que pueda contrarrestarse para permitir que la trombina lleve a cabo su actividad biológica en sustratos heterólogos, incluida la conversión de fibrinógeno a fibrina.

60 El término "fragmento de trombina" incluye una secuencia de aminoácidos de trombina, lineal o no lineal, que mantiene la actividad de la trombina, *p. ej.*, la actividad autolítica de la trombina y/o la escisión de fibrinógeno mediada por la trombina.

65 Aquí se proporcionan métodos para usar oligonucleótidos aislados que se unen a la trombina para la inhibición y estabilización de la actividad de la trombina. Además, se proporcionan aquí formulaciones de trombina que comprenden trombina y oligonucleótidos de unión a trombina y métodos para revertir la inhibición de la trombina

y sus usos para convertir el fibrinógeno en fibrina.

"Nucleótido" está destinado a abarcar un monómero de un ácido nucleico, que incluye pero no se limita a desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos, que pueden ser naturales o sintéticos, o modificados o no modificados. Las modificaciones incluyen cambios en el resto de azúcar, el resto de base y/o los enlaces entre los ribonucleótidos en el oligoribonucleótido. Por consiguiente, como se usa en el presente documento, el término "desoxirribonucleótido" abarca desoxirribonucleótidos naturales y sintéticos, no modificados y modificados y el término "ribonucleótido" abarca ribonucleótidos naturales y sintéticos, no modificados y modificados.

El término "nucleótido modificado" se refiere a nucleótidos que tienen uno o más sustituyentes no naturales que funcionan de manera similar a los nucleótidos naturales. Dichos nucleótidos modificados pueden preferirse sobre las formas naturales debido a propiedades deseables tales como, *p. ej.*, afinidad mejorada por una diana (*p. ej.*, diana proteica u oligonucleótido antisentido) y mayor estabilidad de la nucleasa. Los ejemplos no limitativos incluyen modificaciones de azúcar 2' tales como 2'O-metilo, 2'O-etilo, 2'fluoro y similares; restos de azúcar modificados que incluyen ácidos nucleicos puenteados (*p. ej.*, LNA y ENA descritos en la publicación de patente PCT N° WO 98/39352, WO 00/47599 y WO 99/14226) y altritol (*p. ej.*, Allart, et al., 1998. *Nucleosides & Nucleotides* 17:1523-1526; Herdewijn et al., 1999. *Nucleosides & Nucleotides* 18:1371-1376; Fisher et al., 2007, *NAR* 35 (4):1064-1074); enlaces internucleotídicos modificados que incluyen enlaces de fosforotioato, fosfonocarboxilato y/o fosfinocarboxilato (*p. ej.*, las Patentes de los EE.UU. N°s 6.693.187 y 7.067.641).

Oligonucleótido" se refiere a una secuencia de desoxirribonucleótidos, una secuencia de ribonucleótidos o una quimera de ADN y ARN de aproximadamente 8 a aproximadamente 60 nucleótidos. Cada nucleótido de ADN o ARN que forma el oligonucleótido puede ser independientemente natural o sintético, y puede no modificarse o modificarse (por ejemplo como se describe más arriba). La secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido se escribe de acuerdo con la notación convencional, con el término 5' en la mano izquierda de la secuencia y el término 3' en la mano derecha de la misma. Los oligonucleótidos se pueden proporcionar como sales, por ejemplo una sal de sodio.

Por "complementariedad" se entiende que un ácido nucleico puede formar enlaces de hidrógeno con otra secuencia de ácido nucleico mediante el enlace clásico de Watson-Crick u otro enlace no tradicional. La complementariedad puede ser total o parcial. Como se usa en el presente documento, el oligonucleótido de unión a trombina tiene complementariedad con el oligonucleótido antisentido.

Como se usa en el presente documento, el término "aptámero" es una secuencia de ácido nucleico que se une a una diana molecular como una molécula pequeña, un péptido, una proteína e incluso un microorganismo como un virus o una bacteria. Los aptámeros se seleccionan incubando la molécula diana con un gran conjunto de aglutinantes como los oligonucleótidos (generalmente de aproximadamente 10 a 60 mers). Uno de los métodos para la selección de aptámeros oligonucleotídicos se llama "evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial" (SELEX) se usa generalmente con modificaciones y variaciones para la selección de aptámeros específicos.

En las realizaciones preferidas descritas aquí, el aptámero es un ADN y/o ARN (ADN, ARN o ADN/ARN de quimera) e incluye nucleótidos no modificados o modificados.

En algunas realizaciones, el aptámero o una sal de dicho aptámero es un oligonucleótido monocatenario de ARN o ADN que se une a una proteína diana y generalmente no exhibe efectos no específicos. Los aptámeros pueden modificarse para estabilidad u otras cualidades deseadas de acuerdo con cualquier modificación de ácido nucleico conocida por un experto en la materia.

Los tioaptámeros son aptámeros que contienen modificaciones de azufre en sitios específicos de fosforilo internucleosídico, y pueden poseer mayor estabilidad, resistencia a nucleasas, afinidad y/o selectividad diana. Los ejemplos de tioaptámeros incluyen fosforomonotioato (S-ODN) y tioaptatores de oligodesoxi de fosforoditioato (S2-ODN). Se puede encontrar más información sobre aptámeros y tioaptámeros en las Patentes de los EE.UU. N°s 5.218.088 y 6.423.493.

Los aptámeros de unión a trombina (TBA) son conocidos por su uso potencial como anticoagulantes. Sin embargo, debido a su corta vida media en sangre, se ha demostrado que su uso no es eficiente (véase Bock, et al., 1992. *Nature*. 1992 355 (6360): 564-6.; Tasset y Kubik, 1997, *J Mol Biol*. 272 (5): 688-98; Dougan et al., 2000 27 (3): 289-97; DeAnda, et al., 1994 58 (2): 344-50; Griffen et al., 1993 *Blood* 81: 3271-76; Publicaciones de Patentes PCT N°s WO2007/025049 y WO2010/033167).

Los oligonucleótidos antisentido son moléculas de ADN o ARN de cadena sencilla o quimeras de ADN y ARN o análogos de ADN o ARN de aproximadamente 8 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. Como se usa en el presente documento, un oligonucleótido antisentido comprende una secuencia que es complementaria al oligonucleótido de unión a trombina. El oligonucleótido antisentido puede tener la misma longitud que el oligonucleótido de unión a trombina. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido comprenden residuos adicionales, o pueden ser un fragmento de los mismos, siempre que retengan la afinidad de unión al oligonucleótido de unión a

trombina para invertir la unión del oligonucleótido de unión a trombina a trombina. El oligonucleótido antisentido puede unirse adicionalmente de manera covalente o no covalente, o asociarse a un resto nucleótido o no nucleótido o una molécula que puede incluir uno o más de, *p. ej.*, un nucleótido, un análogo de nucleótido, un aminoácido, un péptido, un polipéptido, un resto lipídico, un resto carbohidrato, un marcador, una matriz, cualquier tipo de perlas o una etiqueta. El antisentido se puede unir a las moléculas anteriores a través de un conector tal como, pero sin limitarse a varias longitudes de cadenas de oligonucleótidos poli-A o poli-T, cadenas de polipéptidos, cadenas alifáticas. En una realización, el conector disminuirá la interferencia estérica.

El oligonucleótido antisentido puede incluir además una o más modificaciones, como se describió anteriormente.

En algunas realizaciones, la secuencia de oligonucleótidos antisentido comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 7-12. En algunas realizaciones, la secuencia de oligonucleótidos antisentido se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 7-12. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido es una sal, *p. ej.*, una sal de sodio. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido se proporciona como una solución que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para revertir una trombina inhibida por oligonucleótidos, el método comprende los pasos de poner en contacto la trombina inhibida por oligonucleótidos con un antisentido al oligonucleótido, en donde el antisentido al oligonucleótido se inmoviliza en una fase sólida.

El objeto de la presente invención es también una fase sólida o soporte unido covalentemente a un oligonucleótido antisentido de un oligonucleótido de unión a trombina.

El soporte es preferiblemente un material cromatográfico que puede unirse al oligonucleótido antisentido. El material cromatográfico a emplear según el método de la invención es, *p. ej.*, un material hidrofílico, tal como agarosa, celulosa, vidrio de poro controlado, geles de sílice, dextranos o material cerámico o un polímero artificial orgánico tal como a base de poliestirenos de poliacrilamidas. Los materiales típicos están disponibles comercialmente con los nombres comerciales Agarosa, Sephadex®, Sefarosa®, SephAcril® (GE, Suecia), Ultragel® (Biosepara, Francia), TSK-Gel, Toyopearl® (Toso Corp., Japón), HEMA (Alltech Ass. (Deerfield, IL, EE.UU.), Eupergit® (Rohm Pharma, Darmstadt, Alemania), Fractogel®, Eshmuno® (Merck Millipore, EE.UU.), Ceramic HyperD® (Pall, EE.UU.). También materiales basados en azlactonas (3M, St. Paul, Minn, EE.UU.) puede ser utilizado.

Una realización emplea un material cromatográfico en partículas o un material de bloque monolítico. El material en partículas se puede suspender en un medio apropiado y la suspensión resultante se puede usar, *p. ej.*, en una columna cromatográfica. Sin embargo, el material puede usarse en un lote.

En una realización, el antisentido está unido a un soporte preferiblemente a través de un conector, en particular un conector bifuncional, entre el soporte y el antisentido. Si se usa un conector bifuncional, se puede seleccionar del grupo que consiste en N-hidroxisuccinimida, DAPA, CNBr, epoxi, diaminodipropilamina (DADPA), 1,6 diaminohexano, ácido succínico, 1,3 diamino-2-propanol, etilendiamina (EDA), TNB, piridildisulfuro, yodoacetamida, soporte activado con maleimida o combinaciones de los mismos.

El soporte para realizar el método de la invención se puede modificar mediante un resto que reacciona con grupos amino primarios o secundarios.

Además, un soporte o fase sólida que tiene el antisentido unido covalentemente también es objeto de la presente invención. El soporte de la invención es preferiblemente un material cromatográfico, tal como un material cromatográfico hidrófilo tal como dextrano o un polímero artificial orgánico tal como se mencionó anteriormente.

El material cromatográfico que forma el soporte puede ser un material en partículas o un material de bloque monolítico. *P. ej.*, este último se describe en Hermanson et al., (Hermanson GT, Mallia AK y Smith PK 1992 "Immobilization Affinity Ligand Techniques" págs. 454 Academic Press, Inc. San Diego, EE.UU.).

En otra realización preferida de la invención, el antisentido está unido al soporte a través de un conector entre el soporte y el antisentido. Esto es ventajoso cuando el soporte no tiene grupos funcionales capaces de unir el antisentido covalentemente. Luego, el soporte se funcionaliza primero y luego reacciona con un enlazador que puede unir el antisentido. Los brazos o correas espaciadores son moléculas de bajo peso molecular que se utilizan como enlaces intermedios entre un soporte o matriz y un ligando de afinidad, como el antisentido. Preferiblemente, los separadores comprenden dos grupos funcionales en ambos extremos para facilitar el acoplamiento al ligando y al soporte. El gápmo es típicamente un compuesto hidrocarbonado que tiene dos grupos funcionales en sus extremos. Uno de los dos extremos está unido covalentemente a la matriz usando reacciones conocidas convencionales o per se. El segundo extremo está unido covalentemente al ligando usando otro procedimiento de acoplamiento.

Un ejemplo de un enlazador bifuncional como N-hidroxi succinimida, DAPA, CNBr, epoxi, diaminodipropilamina (DADPA), 1,6 diaminohexano, ácido succínico, 1,3 diamino-2-propanol, etilendiamina (EDA),

TNB, piridildisulfuro, yodoacetamida, soporte activado con maleimida o combinaciones de los mismos.

Dado que muchos soportes funcionalizados están disponibles comercialmente, puede ser ventajoso comenzar con un soporte modificado por un resto que reacciona con grupos amino primarios o secundarios.

Una trombina inhibida por oligonucleótidos es una trombina combinada con un oligonucleótido, dicho oligonucleótido puede unirse a la trombina en una solución acuosa de trombina y el oligonucleótido inhibe la actividad de la trombina, al menos parcialmente.

Los oligonucleótidos antisentido inmovilizados a una fase sólida o soporte son oligonucleótidos antisentido que están unidos covalentemente y/o no covalentemente a una fase sólida o soporte. Los ejemplos de antisentido de unión covalente a una fase sólida se describieron anteriormente. En una realización, el antisentido se une a la fase sólida mediante unión no covalente. En un ejemplo, una fase sólida se une covalentemente a estreptavidina y el oligonucleótido antisentido se une covalentemente a biotina. El antisentido biotinilado se une de forma no covalente a la fase sólida unida a estreptavidina a través de la unión por afinidad de biotina estreptavidina.

Se pueden unir diferentes cantidades (es decir, concentraciones) de antisentido en un soporte. El aumento de la concentración antisentido en el soporte puede acelerar la inversión de la inhibición, lo que da como resultado un aumento de la actividad/reactivación de la trombina.

Típicamente, un aumento de la actividad de la trombina después de la inhibición con el oligonucleótido usando un oligonucleótido antisentido (p. ej., un aptámero) se refiere a la reactivación de la trombina. Trombina reactivada, es la trombina que tiene una mayor actividad en comparación con la actividad de la trombina inhibida por oligonucleótidos.

La trombina reactivada también puede referirse a la trombina que tiene una mayor actividad en comparación con la actividad de la trombina después de que se combina con el oligonucleótido capaz de inhibir y unir la trombina.

El uso de un antisentido inmovilizado en un soporte (p. ej., un filtro) con un dispositivo, recipiente, cámara, recipiente, aplicador de entrega, barril, jeringa, etc. permite liberar la trombina reactivada.

El dispositivo también puede incluir una malla para evitar o minimizar el paso del soporte a través de una abertura, como una abertura de entrega.

En algunas realizaciones, el dispositivo comprende al menos una malla; la malla está configurada para retener las perlas dentro del dispositivo.

En algunas realizaciones, el tamaño de malla (es decir, el tamaño de los poros en el mismo) es al menos 1,5 veces menor (p. ej., 2 veces menor) que el tamaño del cordón más pequeño. Ejemplos no limitantes de malla son rejillas, materiales grabados, redes de polímeros y similares. Las mallas pueden estar compuestas de cualquier material, p. ej., material biocompatible, como plástico, nylon, celulosa, aleaciones, vidrio y similares. El dispositivo puede comprender más de un elemento de malla. El papel de filtro es un ejemplo de una malla, en diferentes realizaciones; Se pueden utilizar otras estructuras de malla (es decir, que no sean papel de filtro).

Un oligonucleótido (p. ej., un aptámero) inhibió la trombina contenida en un recipiente (p. ej., una jeringa) podría mezclarse con el oligonucleótido antisentido (p. ej., antisentido del aptámero), el antisentido puede unirse a una fase sólida o soporte (p. ej., perlas), para reactivar la trombina, al menos parcialmente, y la trombina después de la reactivación se puede aplicar (p. ej., expulsar de la abertura de una jeringa) en una superficie deseada. En caso de usar oligonucleótidos antisentido (p. ej., antisentido de aptámero) unidos en una fase sólida o soporte (p. ej., perlas), antes de la aplicación (p. ej., antes de expulsar de la abertura de una jeringa) las perlas se separan de la mezcla, p. ej., por filtración, precipitación a lo largo del tiempo por la fuerza de gravitación y/o después de centrifugación.

P. ej., la separación/eliminación se puede lograr utilizando al menos una malla, p. ej., colocada en la abertura de entrega y/o antes de la abertura de entrega.

Alternativamente o además, las perlas se pueden separar/eliminar de un líquido o de una mezcla por decantación.

Típicamente, la decantación es un proceso para la separación de mezclas eliminando una capa de líquido, generalmente de la cual se ha asentado un precipitado.

Un precipitado puede ser perlas unidas al oligonucleótido antisentido. El antisentido unido a las perlas puede complejarse con el oligonucleótido capaz de unirse a la trombina.

Las perlas pueden sedimentarse, p. ej., centrifugarse durante 1 min centrifugado a aproximadamente 5000 g y se puede recoger el sobrenadante que contiene la trombina reactivada.

Una "superficie" es una posición o ubicación donde se desea aplicar la trombina reactivada, *p. ej.*, un tejido sangrante o una herida en el sujeto que lo necesita. La superficie depende del uso de la trombina reactivada. La trombina reactivada puede usarse, *p. ej.*, en combinación con fibrinógeno, *p. ej.*, en hemostasia, fijación de tejido, fijación de injerto, cicatrización de heridas y anastomosis.

5 Se proporciona un aplicador de entrega que comprende:
 un barril que contiene un oligonucleótido inhibió la trombina; y
 un recipiente que tiene una abertura de suministro y que contiene un oligonucleótido antisentido unido a una fase
 10 sólida;
 en donde el barril y el recipiente son capaces de estar en comunicación fluida, de modo que después de la comunicación fluida y el contacto de la trombina inhibida con la fase sólida, la actividad de la trombina se incrementa/reactiva, antes de administrar la trombina a través de la abertura de administración.

15 El aplicador de suministro de la reivindicación 34, en donde la comunicación fluida es a través de una abertura resellable colocada entre el barril y el recipiente.
 Se proporciona un aplicador de entrega que comprende:
 un recipiente que contiene un oligonucleótido inhibió la trombina; y un oligonucleótido antisentido unido a una fase
 20 sólida, en donde el oligonucleótido inhibe la trombina y el oligonucleótido antisentido se mantienen en cámaras separadas que pueden estar en comunicación fluida, de modo que la comunicación fluida entre las cámaras y el contacto entre la trombina inhibida y la fase sólida da como resultado un aumento de la actividad de trombina, o trombina reactivada, antes del parto, y en donde el barril tiene una abertura resellable para el suministro a través de la trombina.
 El aumento de la actividad de la trombina se compara con la actividad de la trombina mientras el oligonucleótido lo
 25 inhibe.

En una realización, las cámaras se dividen por un tabique, que es al menos parcialmente rompible, el frenado del tabique permite mezclar la trombina inhibida por oligonucleótidos y el oligonucleótido antisentido antes de la
 30 administración.

En algunas realizaciones, el recipiente y/o las cámaras son flexibles y se puede romper el tabique aplicando presión sobre el recipiente y/o las cámaras.

El tamaño de cada cámara y los volúmenes de llenado dependen, *p. ej.*, del uso previsto, relaciones de concentración adecuadas entre los oligonucleótidos antisentido y el oligonucleótido de unión a trombina, y/o el volumen deseado.

La abertura de entrega del contenedor y/o cámara puede ser un Luer Lock macho o hembra.

40 En algunas realizaciones, el contenedor comprende dos o más cámaras como se describe en el documento WO1997042897A1, *p. ej.*, la Fig. 19.

"Rompible" puede ser intercambiable con el término "despegable" y "frangible".

45 El término "contacto" se refiere a una acción de combinación que, *p. ej.*, pone en contacto la trombina inhibida por oligonucleótidos con el antisentido de manera que se producirá una interacción de unión entre el antisentido y el oligonucleótido y/o pone el oligonucleótido en contacto con la trombina de una manera que permite una interacción de unión entre la trombina y el oligonucleótido.

50 El término "contactar" incluye el término "agregar" y el término "adición".

La acción de combinación puede ser durante un período de tiempo suficiente que permita el contacto, la unión y/o la formación de complejos, *p. ej.*, entre el antisentido y el oligonucleótido y/o la trombina y el oligonucleótido.

55 En algunas realizaciones, el antisentido está unido a la fase sólida directa o indirectamente.

En algunas realizaciones, la fase sólida se selecciona del grupo que consiste en perlas y filtros de medios cromatográficos. Los medios cromatográficos (perlas) pueden incluir, entre otros, agarosa reticulada, dextrano reticulado, metacrílico, polivinilo, materiales basados en sílice. Estos pueden cargarse y/o modificarse para permitir la unión covalente o no covalente de nucleótidos antisentido. El grado del grano (tamaño) puede variar desde superfino (tamaño medio de 20 micras) hasta grueso (tamaño medio de 150 micras).
 60

Los filtros pueden incluir, entre otros, PVDF, polipropileno, a base de nylon. En algunas realizaciones, los filtros pueden tener una construcción de membrana o profundidad. Estos pueden cargarse y/o modificarse para permitir la unión covalente o no covalente de nucleótidos antisentido. La porosidad del filtro (clasificación) puede variar entre 0,45 micras y hasta aproximadamente 20 micras.
 65

La "trombina" o "polipéptido de trombina" es una proteasa de serina de mamífero que forma parte de la cascada de coagulación sanguínea y convierte el fibrinógeno en hebras insolubles de fibrina, además de catalizar otras reacciones relacionadas con la coagulación. En humanos, la protrombina está codificada por el gen F2, y el polipéptido resultante se escinde proteolíticamente en la cascada de coagulación para formar trombina. La trombina sirve, entre otras cosas, como un componente activo en varios productos de hemostasia. P. ej., los selladores de fibrina comprenden típicamente un componente de fibrinógeno y un componente de trombina. Cuando se mezclan ambos componentes (p. ej., cuando se aplica a una herida sangrante) la trombina escinde el fibrinógeno y se forma un polímero de fibrina.

La trombina es una proteasa de serina que resulta de la escisión de la protrombina (Factor II), un precursor del zimógeno, por otra proteasa de serina (Factor Xa). La trombina humana es una proteína de 295 aminoácidos compuesta de dos cadenas de polipéptidos unidas por un enlace disulfuro.

El zimógeno se escinde en el residuo 155 y el residuo 271, eliminando los aminoácidos N-terminales 271 completos. Una escisión intramolecular adicional por el Factor Xa en el residuo 320 produce la molécula de alfa trombina activa que es un polipéptido de 295 aminoácidos (humano) compuesto de una cadena pesada y ligera unida a través de un enlace S-S único (Krishnaswamy J, (2013) "The transition of prothrombin to thrombin". J Thromb Haemost. Jun; II Suppl 1:265-76). La trombina, al ser una proteasa de serina, puede iniciar su propia degradación ("autólisis") escindiendo otras moléculas de trombina en los sitios beta (residuo 382 y 394) o gamma (residuo 443 y residuo 474), produciendo trombina beta y gamma, respectivamente. Ninguno de estos bucles contiene un sitio clásico de reconocimiento de trombina, ni esta escisión es específica de un determinado residuo dentro de los bucles. Por el contrario, estos bucles son flexibles y están expuestos y se cortan por falta de un sustrato adecuado y especialmente a una alta concentración de trombina (véase, p. ej., Chang, JY. Biochem. J. (1986) 240: 797-802, "The structures and proteolytic specificities of autolysed human thrombin"; Rydel TJ, et al., J Biol Chem. 1994, 269 (35):22000-6. Crystallographic structure of human gamma-thrombin"; Pozzi N, et al., Biophys Chem. 2011, 159 (1): 6-13 "Rigidification of the autolysis loop enhances Na(+) binding to thrombin"). La inactivación de la trombina *in vivo* no se produce a través de este mecanismo (autólisis) sino a través de una interacción específica (puenteada por heparina) con el inhibidor de la proteasa de serina (SERPIN), antitrombina III (ATIII). La interacción de la trombina (y varias otras proteasa de serinas homólogas como el Factor X e incluso la proteína C) con ATIII está mediada a través del bucle gamma (ver, p. ej., Yang, L., Blood. 2004, 104 (6):1753-9, "Heparin-activated antithrombin interacts with the autolysis loop of target coagulation proteases"; y Marino, F, J Biol Chem. 2010, 285(25):19145-52. "Engineering thrombin for selective specificity toward protein C and PARI").

La trombina humana, no humana, recombinante o no recombinante puede usarse dentro de la presente invención. La trombina se usa médicamente, p. ej., como agente hemostático y como componente de adhesivos tisulares.

La "actividad de la trombina" incluye la conversión de sustratos heterólogos mediada por trombina, incluidas las proteínas, p. ej., fibrinógeno en fibrina, así como la conversión de Factor VIII en Factor VIIIa, XI en XIa, XIII en XIIIa y Factor V en Va.

Un "sustrato heterólogo" es un sustrato, preferiblemente un sustrato de proteínas, distinto de la trombina. En algunas realizaciones, la actividad de trombina se refiere a la conversión de fibrinógeno en fibrina.

El término "estabilizar" significa, p. ej., mantener la actividad de trombina dentro de la solución líquida de trombina a un nivel de aproximadamente 70% a aproximadamente 100% (p. ej., aproximadamente 80% a 100% o 90% a 100%) en comparación con la actividad de trombina inicial, p. ej., después de uno, 2, 3, 6, 9 y hasta 12 meses a temperatura ambiente y/o 2, 3, 4 semanas y hasta 1 mes a 37°C y/o 3, 6, 9, 12, 18 y hasta 24 meses a 2-8°C en forma líquida. Una solución de trombina es estable cuando, p. ej., la actividad autolítica y otras proteasas es mínima o ausente. El término "inhibir la actividad de la trombina" significa, p. ej., prevenir, parcial o totalmente, la autólisis de trombina y/o la escisión de un sustrato de trombina, por ejemplo fibrinógeno. En algunas realizaciones, inhibir la actividad de trombina se refiere a prevenir o reducir la autólisis de trombina en una solución acuosa de trombina líquida, de modo que aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o preferiblemente mayor que 90% de trombina sin escindir permanece en la solución.

Para el almacenamiento a largo plazo, la formulación, que comprende la trombina y el oligonucleótido de unión a trombina, se divide en alícuotas en viales estériles, ampollas u otros recipientes, que luego se sellan. En una realización, se usa un sello que permite la eliminación de la composición de trombina estabilizada con una jeringa a través del sello. El contenedor está etiquetado de acuerdo con la práctica estándar en el campo de los dispositivos farmacéuticos o médicos.

El contenedor se proporciona en un kit con un segundo contenedor que contiene un oligonucleótido antisentido. En otra realización, el contenedor se proporciona en un kit con todavía un tercer contenedor que comprende un componente que comprende fibrinógeno. El kit puede comprender además un dispositivo de aplicación, tal como un pulverizador, una jeringa o similar y/o un diluyente y/o instrucciones de uso.

Para su uso, la formulación de trombina estabilizada, *p. ej.*, una formulación de trombina líquida acuosa que comprende una trombina y un oligonucleótido de unión a trombina, puede usarse directamente desde el recipiente o puede diluirse adicionalmente a la concentración deseada, generalmente la actividad de trombina en la formulación es de aproximadamente 1 UI/ml a aproximadamente 15.000 UI/ml, aproximadamente 20 UI/ml a 15.000 UI/ml, o 100 UI/ml a 5.000 UI/ml, 200 UI/ml a aproximadamente 1000 UI/ml o aproximadamente 300 UI/ml a aproximadamente 1000 UI/ml, aunque la concentración real será determinada por el usuario (*p. ej.*, asistente médico, médico, enfermero, médico), es decir, de acuerdo con las necesidades del paciente individual y la gravedad de la hemorragia. La formulación de trombina estabilizada puede aplicarse al tejido sangrante para lograr la hemostasia, *per se* o puede usarse en combinación con un armazón o matriz, *p. ej.*, un armazón o matriz absorbible. La formulación de trombina estabilizada también puede usarse como un componente de adhesivo tisular, sellador de fibrina o pegamento de fibrina. Estos y otros usos conocidos en la técnica de la formulación de trombina se contemplan para la trombina estabilizada descrita. Se han informado numerosos usos del pegamento de fibrina en diversos campos, incluido el uso como sellador, *p. ej.*, para sellar fugas, agente hemostático/detener el sangrado, prevención de adhesión, para mejorar la curación, para unir estructuras, en una variedad de cirugías abiertas y laparoscópicas.

Los andamios hemostáticos preferidos son polímeros absorbibles naturales o genéticamente modificados o polímeros absorbibles sintéticos, o mezclas de los mismos. Ejemplos de polímeros absorbibles naturales o genéticamente modificados son proteínas, polisacáridos y combinaciones de los mismos. Las proteínas incluyen protrombina, trombina, fibrinógeno, fibrina, fibronectina, heparinasa, Factor X/Xa, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa, Factor XI/XIa, Factor XII/XIIa, factor tisular, batroxobina, ancrod, ecarina, Factor von Willebrand, colágeno, elastina, albúmina, gelatina, glucoproteínas de la superficie de las plaquetas, vasopresina, análogos de vasopresina, epinefrina, selectina, veneno procoagulante, inhibidor del activador del plasminógeno, agentes activadores de plaquetas, péptidos sintéticos con actividad hemostática, y/o combinaciones de los mismos. Los polisacáridos incluyen, sin limitación, celulosa, alquilcelulosa, *p. ej.* metilcelulosa, alquilhidroxialquilcelulosa, hidroxialquilcelulosa, sulfato de celulosa, sales de carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboxietilcelulosa, quitina, quitina de carboximetilo, ácido hialurónico, sales de ácido hialurónico, ácido hialurónico, sales de ácido hialurónico, ácido hialurónico, sales de ácido hialurónico, alginato de propilenglicol, glucógeno, dextrano, sulfato de dextrano, curdlán, pectina, pululano, xantano, condroitina, sulfatos de condroitina, carboximetilo dextrano, carboximetilquitosano, quitosano, heparina, sulfato de heparina, heparán, sulfato de sulfato, sulfato de sulfato de sodio carragenanos, quitosano, almidón, amilosa, amilopectina, polina-glucosamina, ácido polimanurónico, ácido poliglucurónico y derivados de cualquiera de los anteriores. Ejemplos de polímeros absorbibles sintéticos son los polímeros de poliéster alifático, copolímeros y/o combinaciones de los mismos.

Como se usa en este documento, los artículos indefinidos "un" y "una" significan "al menos uno" o "uno o más" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Como se usa en el presente documento, los términos "que comprende", "que incluye", "que tiene" y las variantes gramaticales de los mismos deben tomarse como especificación de las características, pasos o componentes establecidos, pero no excluyen la adición de una o más características, pasos, componentes adicionales o grupos de los mismos.

Cuando un valor numérico va precedido por el término "aproximadamente", el término "aproximadamente" pretende indicar +/-10%.

Una "secuencia codificante de polinucleótidos" o una secuencia que "codifica" un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe en ADN o ARN o se transcribe y traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas (o "elementos de control"). Los límites de la secuencia de codificación están determinados por un codón de inicio en el terminal 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el terminal 3' (carboxilo). Una secuencia de terminación de la transcripción puede ubicarse 3' respecto a la secuencia de codificación. Los "elementos de control" típicos incluyen, entre otros, reguladores de la transcripción, tales como promotores, elementos potenciadores de la transcripción, señales de terminación de la transcripción y secuencias de poliadenilación; y reguladores de la traducción, tales como secuencias para la optimización del inicio de la traducción, *p. ej.*, secuencias de Shine-Dalgarno (sitio de unión al ribosoma), secuencias de Kozak (es decir, secuencias para la optimización de la traducción, ubicadas, *p. ej.*, 5' de la secuencia de codificación), secuencias líderes (heterólogas o nativas), codón de iniciación de la traducción (*p. ej.*, ATG) y secuencias de terminación de la traducción. Los promotores pueden incluir promotores inducibles (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente al promotor es inducida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), promotores represibles (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente al promotor está incluida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.) y promotores constitutivos.

"Enlazado operativamente" se refiere a una disposición de elementos en donde los componentes así descritos están configurados para realizar su función habitual. Por lo tanto, un promotor dado unido operativamente a una secuencia codificante es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante cuando están presentes las enzimas apropiadas. El promotor no necesita estar contiguo a la secuencia de codificación, siempre que funcione para dirigir la expresión de la misma. Por lo tanto, *p. ej.*, las secuencias transcritas aún no traducidas que intervienen pueden

estar presentes entre la secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora todavía puede considerarse "operativamente unida" a la secuencia codificante.

Una molécula de ácido nucleico "recombinante" como se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación: (1) no está asociado con todo o una porción del polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza; y/o (2) está unido a un polinucleótido diferente al que está unido en la naturaleza. El término "recombinante" como se usa con respecto a una proteína o polipéptido significa un polipéptido producido por expresión de un polinucleótido recombinante. "Células huésped recombinantes", "células huésped", "células", "líneas celulares", "cultivos celulares" y otros términos similares que denotan microorganismos procariotas o líneas celulares eucariotas cultivadas como entidades unicelulares, se usan indistintamente y se refieren a células que pueden ser, o han sido, utilizadas como receptores para construcciones, vectores u otro ADN de transferencia, e incluye la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Se entiende que la progenie de una sola célula parental puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total del progenitor original, debido a una mutación accidental

o deliberada. La progenie de la célula parental que es suficientemente similar a la parental para caracterizarse por la propiedad relevante, como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido deseado, se incluye en la progenie prevista en esta definición, y está cubierta por los términos anteriores.

Los oligonucleótidos descritos aquí pueden sintetizarse químicamente o producirse de forma recombinante. Los oligonucleótidos de ADN y ARN, que incluyen quimeras de ARN y ADN o análogos de ARN y/o ADN, pueden sintetizarse usando protocolos conocidos en la técnica, *p. ej.*, como se describe en Caruthers et al., 1992, *Methods in Enzymology* 211, 3-19; Publicación PCT N° WO 99/54459, Wincott et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677-2684, Wincott et al., 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59, Brennan et al., 1998, *Biotechnol Bioeng.*, 61, 33-45, y Brennan, patente de EE.UU. N° 6.001.311; Usman et al., 1987, *J. Am. Chem Soc.*, 109, 7845; Scaringe et al., 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18, 5433.

En una realización, los oligonucleótidos descritos aquí se sintetizan químicamente. En otras realizaciones, los oligonucleótidos descritos en el presente documento se producen *in vivo* o *ex vivo* por expresión de ADN recombinante en células huésped procariotas o eucariotas para generar oligonucleótidos de ADN y/o ARN. En diversas realizaciones, se proporciona un péptido recombinante codificado por una secuencia de ácido nucleico aislada. En algunas realizaciones, el oligonucleótido de unión a trombina comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 6. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 7 a 12. Por consiguiente, en este documento se proporciona un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico usada para generar un oligonucleótido de ADN o ARN, unido operativamente a un elemento promotor. Además se proporciona una célula huésped que comprende dicho vector.

Como se usa en el presente documento, se dice que un oligonucleótido o aptámero "interactúa" o se "une" a una proteína (*p. ej.*, oligonucleótido de unión a trombina con trombina) si se asocia con proteína preferiblemente a través de fuerzas de unión no covalentes, por ejemplo van der Waals y fuerzas electrostáticas.

Se entiende que "temperatura ambiente" incluye una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 28°C, o de 22°C a aproximadamente 26°C.

Como se usa en el presente documento, los términos "autólisis" o "autodegradación" se refieren a la degradación molecular desfavorable de la trombina en una forma inactiva o parcialmente activa.

Un oligonucleótido de unión a trombina preferido como se describe en el presente documento, es capaz de inhibir reversiblemente la actividad de trombina, *p. ej.*, reduciendo la autólisis de trombina y la actividad de trombina hacia fibrinógeno en donde la inhibición es reversible con un oligonucleótido antisentido. Sin desear limitarse a la teoría, el oligonucleótido antisentido tiene una afinidad de unión más fuerte al oligonucleótido de unión a trombina que la trombina al oligonucleótido de unión a trombina.

El término "afinidad" se refiere a la fuerza de unión y puede expresarse cuantitativamente como una constante de disociación (Kd).

En una realización, el oligonucleótido de unión a trombina interactúa con el oligonucleótido antisentido descrito en la presente memoria con al menos 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 1,55, afinidad 2 veces mayor, más preferiblemente al menos 5 veces mayor afinidad e incluso más preferiblemente al menos 10 veces mayor afinidad de la que interactúa con la trombina. La afinidad de unión (es decir, Kd) se puede determinar utilizando técnicas estándar.

El término "una cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un oligonucleótido antisentido descrito en el presente documento requerido para unir el oligonucleótido de unión a trombina e invertir la inhibición de la actividad

de la trombina.

Los vehículos, disolventes, diluyentes, excipientes y vehículos "farmacéuticamente aceptables" o "farmacológicamente aceptables" generalmente se refieren a cargas, diluyentes o material encapsulante sólido o líquido inerte, no tóxico que no reacciona con los ingredientes activos de las composiciones descritas aquí. Los excipientes aceptables incluyen, sin limitación, solución salina; ácido acético o acetato; iones calcio, sodio y cloruro; manitol; albúmina; o combinación de los mismos.

La invención proporciona oligonucleótidos útiles en la práctica de la presente invención.

En el presente documento se proporcionan compuestos y métodos para estabilizar la actividad de trombina en formulaciones de trombina líquida, en donde estabilizar la actividad de trombina se refiere, *p. ej.*, a reducir o prevenir la actividad autolítica y biológica. Los detalles de los oligonucleótidos ejemplares útiles en la práctica de la invención, se proporcionan en el Ejemplo 1, más adelante y en el listado de secuencias, incorporado aquí.

En el presente documento se proporcionan métodos de detección de oligonucleótidos capaces de estabilizar reversiblemente la actividad de trombina. Por consiguiente, se proporciona un método para seleccionar un oligonucleótido capaz de inhibir y, por lo tanto, estabilizar la actividad de la trombina en una formulación líquida de trombina, que comprende

- a. poner en contacto la trombina o un fragmento de la misma, cada uno de los cuales exhibe una actividad inicial de 4 a 15.000 UI/ml, con un conjunto de oligonucleótidos de unión a la trombina de prueba e identificar uno o más oligonucleótidos de unión a la trombina que inhiben, al menos parcialmente, la actividad inicial; y
- b. poner en contacto el oligonucleótido unido a trombina del Paso A) con un conjunto de oligonucleótidos antisentido de prueba;

por lo cual la restauración de al menos 4 UI/ml de actividad de trombina por un antisentido oligonucleotídico después del paso (b) indica: 1) un oligonucleótido de unión a trombina potencial para la estabilización de la trombina; y 2) un oligonucleótido antisentido potencial para revertir el efecto inhibitor del oligonucleótido de unión a trombina.

En algunas realizaciones del método de detección, la trombina tiene una actividad inicial de 4 a 15.000 UI/ml, aproximadamente 20 UI/ml a 15.000 UI/ml, o 100 UI/ml a 5.000 UI/ml, 200 UI/ml a aproximadamente 1000 UI/ml o aproximadamente 300 UI/ml a aproximadamente 1000 UI/ml.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido restaura la actividad de la trombina a al menos 4 UI/ml, al menos aproximadamente 20 UI/ml, al menos aproximadamente 100 UI/ml o al menos aproximadamente 300 UI/ml, al menos aproximadamente 1000 UI/ml y más a 1500 UI/ml de la actividad inicial de trombina.

Alternativamente, se proporciona un método para seleccionar un oligonucleótido capaz de inhibir y, por lo tanto, estabilizar la actividad de la trombina en una formulación líquida acuosa de trombina, que comprende

- a. poner en contacto la trombina o un fragmento de la misma, cada uno de los cuales muestra una actividad inicial, con un conjunto de oligonucleótidos de unión a la trombina de prueba e identificar uno o más oligonucleótidos de unión a la trombina que inhiben al menos el 60% de la actividad inicial; y
- b. poner en contacto un oligonucleótido unido a trombina de el Paso A) con un conjunto de oligonucleótidos antisentido de prueba;

por lo cual la restauración de más del 40% de la actividad inicial por un antisentido oligonucleotídico después del paso (b) indica: 1) un oligonucleótido de unión a trombina potencial para la estabilización de la trombina; y 2) un oligonucleótido antisentido potencial para revertir el efecto inhibitor del oligonucleótido de unión a trombina.

En algunas realizaciones del método, el uno o más oligonucleótidos de unión a trombina inhiben, al menos el 60% de la actividad inicial de la trombina, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85% o al menos 90% de la actividad inicial de trombina.

En algunas realizaciones del método, el oligonucleótido antisentido restaura al menos 40%, 50%, 60%, 70% y hasta 100% de la actividad inicial de trombina.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen además el paso de aislar uno o más oligonucleótidos de unión a trombina de prueba y/o probar uno o más oligonucleótidos antisentido de prueba, su capacidad para inhibir y estabilizar la actividad de trombina.

En algunas realizaciones de los métodos, el conjunto de oligonucleótidos de unión a trombina de prueba incluye uno o más oligonucleótidos de unión a trombina de prueba y el conjunto de oligonucleótidos antisentido de prueba incluye uno o más oligonucleótidos antisentido de prueba.

El fibrinógeno se puede preparar a partir de la composición sanguínea inicial. La composición sanguínea puede ser sangre entera o fracciones de sangre, es decir, un producto de sangre completa como el plasma. El fibrinógeno puede ser autólogo, humano, incluido plasma agrupado, o de fuente no humana. También es posible que el fibrinógeno se prepare por métodos recombinantes o se pueda modificar químicamente.

En una realización de la invención, la solución de fibrinógeno está compuesta de un componente biológicamente activo (BAC) que es una solución de proteínas derivadas del plasma sanguíneo que puede comprender además agentes antifibrinolíticos tales como ácido tranexámico y/o estabilizadores tales como arginina, lisina., sus sales farmacéuticamente aceptables, o sus mezclas. BAC puede derivarse de crioprecipitado, en particular crioprecipitado concentrado.

El término "crioprecipitado" se refiere a un componente sanguíneo que se obtiene del plasma congelado preparado a partir de sangre completa. Se puede obtener un crioprecipitado cuando el plasma congelado se descongela en frío, típicamente a una temperatura de 0-4°C, lo que resulta en la formación de un precipitado que contiene fibrinógeno y factor XIII. El precipitado puede recogerse, por ejemplo por centrifugación y disolverse en un tampón adecuado tal como un tampón que contiene cloruro de sodio 120 mM, citrato trisódico 10 mM, glicina 120 mM, hidrocloreuro de arginina 95 mM. La solución de BAC puede comprender factores adicionales tales como, *p. ej.*, factor VIII, fibronectina, factor von Willebrand (vWF), vitronectina, etc., *p. ej.*, como se describe en los documentos US 6.121.232 y W09833533. La composición de BAC puede comprender estabilizadores tales como ácido tranexámico y clorhidrato de arginina. La cantidad de ácido tranexámico en la solución de BAC puede ser de aproximadamente 80 a aproximadamente 110 mg/ml.

En otra realización, la concentración de plasminógeno y plasmina en la composición de BAC se reduce a igual o inferior a 15 µg/ml, como por ejemplo 5 µg/ml o menos de plasminógeno, *p. ej.*, utilizando un método como se describe en los documentos US 7.125.569, EP 1.390.485 y WO02095019. En otra realización de la invención, cuando se reduce la concentración de plasminógeno y plasmina en la composición de BAC, la composición no contiene ácido tranexámico ni aprotinina.

La solución de fibrinógeno puede ser el componente BAC2 (de EVICEL®) o cualquier otra solución que contenga fibrinógeno, como fibrinógeno recombinante purificado o crioprecipitado producido a partir de plasma humano.

Si bien los siguientes ejemplos demuestran ciertas realizaciones de la invención, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención, sino que contribuyen a una descripción completa de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Oligonucleótidos de unión a trombina

Se identificaron oligonucleótidos de unión a trombina ejemplares en Bock et al., Nature. 1992. 355 (6360): 564-6 y Tasset y Kubik, 1997, J Mol Biol. 272 (5): 688-98. Por simplicidad, estos oligonucleótidos se designaron aquí como Aptámero 1 y 2 de unión a trombina (TBA1 (Bock, 1992), TBA2 (Tasset, 1997)), respectivamente. TBA1, BOCK-15, que se une al EXOSITE 1 de trombina tiene una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 1 5'-GGTTGGTGTGGTTGG o una extensión de SEQ ID NO: 1 establecida en SEQ ID NO: 2 5'-GGGTTGGGTGTGGTTGGG. TBA2, TASSET-29, que se une a la trombina EXOSITE II tiene una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 3 5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT. Las contrapartidas de ARN de los oligonucleótidos de unión a trombina se exponen en SEQ ID NOS: 4-6.

Los aptámeros de unión a trombina tienen una vida media corta en la sangre (Dougan, et al., Nucl Med Biol. 2000. 27 (3): 289-97) y se ha demostrado que al menos TBA1 es seguro (DeAnda et al., Ann Thorac Surg. 1994. 58 (2): 344-50).

Los ejemplos de oligonucleótidos de unión a trombina y oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento se proporcionan en la lista de secuencias adjunta

Ejemplo 2: Estabilización de la actividad de trombina

La trombina líquida acuosa, en su forma purificada y concentrada, 1000 unidades internacionales [UI]/ml y aproximadamente 0,3 mg/ml de trombina, se somete rápidamente a autólisis a temperatura ambiente (RT) causando una pérdida significativa de actividad. Por lo tanto, la actividad de la trombina líquida acuosa se reduce cuando se incuba a temperatura ambiente durante períodos prolongados de tiempo (*p. ej.*, después de 72 a 144 horas), entre otras cosas, debido a la degradación autolítica. La disminución de la estabilidad de la trombina en solución líquida acuosa se puede evaluar midiendo la actividad de la trombina después de períodos prolongados de tiempo a temperatura permisiva (*p. ej.*, RT o 37°C).

Actividad de trombina: ensayo de coagulación: en resumen, se creó una curva estándar de trombina utilizando

entre 4 y 10 unidades internacionales (UI)/ml utilizando una solución estándar validada internamente. Concentraciones más altas de trombina dieron como resultado tiempos de coagulación de fibrina desmesuradamente rápidos y, por lo tanto, las concentraciones respectivas de trombina se extrapolaron de la curva estándar.

5 El tiempo de coagulación se evaluó agregando 40 μ l de trombina a 160 μ l de una solución de fibrinógeno comercial purificada al 0,1% en una cubeta de prueba. El tiempo de coagulación se analizó en una máquina de coagulación automática (Stat4, Stago Diagnostica). La máquina genera un campo electromagnético oscilante que mueve una pequeña bola de metal dentro de la cubeta. Se determinó que la coagulación ocurrió cuando el movimiento de la pelota se detuvo. La concentración de trombina en las muestras de prueba se extrapola a partir de los tiempos de coagulación contra la curva estándar.

15 Las propiedades físicas de los coágulos de fibrina se probaron midiendo el módulo de Young (en kPa) usando una máquina Lloyd Instruments LFplus. Brevemente, se incubaron 8 UI/ml de trombina en un molde moldeado con un volumen equivalente de una solución que contiene fibrinógeno al 7% (BAC2), produciendo 4 UI/ml y concentraciones de trombina y fibrinógeno al 3,5%, respectivamente, durante 30 minutos a 37°C. Después de 30 minutos, el coágulo se colocó en la máquina y se sometió a tracción con fuerza creciente. La pendiente del estiramiento del coágulo en función de la fuerza de tracción (Módulo de Young) se extrapola.

20 Actividad de la trombina para formar sellador de fibrina: ensayo de prueba de caída: en este ensayo, se llenó un barril de un dispositivo sellador de fibrina de dos componentes con una cantidad especificada de trombina (típicamente 200 UI/ml de trombina [$\sim 2\mu$ M]) y el segundo barril se llenó con una solución estándar de BAC2-fibrinógeno ($\sim 7\%$ de fibrinógeno). El dispositivo se colocó sobre un plano inclinado ($\sim 15\text{-}30^\circ$) en donde se colocó papel milimétrico. Una palanca mecanizada empujó ambos barriles simultáneamente, expresando cantidades iguales y medidas de ambas soluciones a través de una punta unida. La gota que contenía la mezcla de los dos componentes goteó cuesta abajo hasta que se formó un coágulo. Se midió la distancia recorrida por la gota, en función de la velocidad de polimerización de fibrinógeno y, por lo tanto, de la concentración efectiva de trombina utilizada.

30 Inhibición reversible de la actividad de trombina por TBA. Se demostró que TBA1 inhibe reversiblemente la actividad de trombina de una manera dependiente de la dosis. Se preparó una solución madre de 10 UI/ml de trombina que es aproximadamente equivalente a 0,1 μ M. Se añadió TBA1 a concentraciones crecientes que van desde la cantidad equimolar (0,1 μ M) y hasta 10 veces mayor (1 μ M) a la trombina, lo que resulta en una inhibición dependiente de la dosis de la actividad de la trombina (Fig. 1, línea de puntos). El concepto de inhibición reversible de la trombina se basa en la posibilidad de un oligonucleótido antisentido para contrarrestar eficazmente la inhibición de la trombina por TBA1. Los oligonucleótidos antisentido (AS) SEQ ID NO: 7 a TBA1 SEQ ID NO: 1 -se agregaron en cantidades equimolares al TBA1, y se dejaron incubar durante 5-30 minutos. Esta solución se usó en el ensayo de actividad de trombina para evaluar la eficacia de la neutralización antisentido de TBA1. De hecho, la neutralización fue eficiente como es evidente por el hecho de que la actividad extrapolada de este ensayo permaneció 10 UI/ml (línea continua en la Fig. 1). En la Fig. 1, el eje x es la concentración de TBA1 y antisentido en micromoles. Tomados en conjunto, los oligonucleótidos antisentido contrarrestan efectivamente la inhibición de la trombina inducida por TBA1 y TBA1 inhibe la trombina 10 UI/ml ($\sim 0,1\ \mu$ M) de una manera dependiente de la dosis. El antisentido equimolar restaura completamente la actividad.

Ejemplo 3: Actividad de trombina con oligonucleótido de unión a trombina y oligonucleótido antisentido

45 Las muestras de 1000 UI/ml de trombina purificada se estabilizaron con concentraciones finales crecientes de TBA1 (SEQ ID NO:1) de 1 μ M y hasta 40 μ M (usando una relación en volumen de trombina de TBA1 1:10). La concentración final de trombina en las muestras mixtas fue de 9 μ M. Las muestras se incubaron hasta 90 días a temperatura ambiente (TA) [Fig. 2A) o 180 días a 2-8°C [Fig. 2C).

50 Las muestras de 1000 UI/ml de trombina purificada se estabilizaron con concentraciones finales crecientes de TBA1 (SEQ ID NO:1) de 1 μ M y hasta 25 μ M (usando una relación de volumen de 1:10 TBA1: trombina). La concentración final de trombina en las muestras mixtas fue de 9 μ M. Las muestras se incubaron durante 14 días a 37°C [Fig. 2B].

55 Para evaluar la actividad de la trombina inhibida, la mezcla de trombina/TBA1 se incubó con un oligonucleótido antisentido (SEQ ID NO: 7) a concentraciones equivalentes a TBA1 durante 30 minutos. Luego, las muestras se diluyeron 100 veces para analizar dentro del rango del ensayo de coagulación de trombina (4-10 UI/ml) en el tampón de prueba, y se analizó la actividad como antes.

60 Las Figuras 2A-2D muestran que TBA1 claramente estabilizó la trombina de una manera dependiente de la dosis. Las Figuras 2A, 2B y 2C muestran el porcentaje de trombina restante cuando se agregó TBA1 a la trombina purificada (como en el componente de trombina del sellador de fibrina EVICEL®, ~ 1000 UI/ml) a las concentraciones indicadas y se incubó a temperatura ambiente durante 90 días (Fig. 2A) a 37°C durante un máximo de 14 días (Fig. 2B) y a 2-8°C durante 180 días (Fig. 2C).

65 A TA, la adición de 25 a 40 μ M TBA1 de actividad de trombina completamente estabilizó durante 3 meses

(Fig. 2A). A 37°C, se perdió menos del 10% de actividad después de 14 días en presencia de 25 µM TBA1 (Fig. 2B).

A 2-8°C, se retuvo una actividad de trombina cercana al 100% con TBA1 40µM después de 180 días (Fig. 2C).

Las actividades restantes de trombina después de la incubación a 37°C durante 7 días en presencia de diferentes concentraciones de TBA1 como en la Figura 2B se representan frente a las concentraciones de TBA1 (Fig. 2D). Por lo tanto, la estabilización de la trombina por TBA1 se correlaciona con la concentración de TBA1 y, por lo tanto, con la inhibición de la trombina. Estos datos muestran que TBA1 estabiliza la trombina en virtud de la inhibición de su actividad autocatalítica.

Ejemplo 4: Propiedades físicas del coágulo preparado con trombina que contiene TBA y oligonucleótido antisentido

Se evaluaron las propiedades físicas de un coágulo formado con trombina que contiene TBA y oligonucleótido antisentido. Se incubaron 8 UI/ml (aproximadamente 0,08 µM) de trombina con 25 µM de TBA1 y 25 µM de oligonucleótido antisentido. Después de que se inició la formación del coágulo mezclando la trombina con una solución que contiene fibrinógeno al 7% (BAC2), y 30 minutos de incubación, se probó la elasticidad del coágulo resultante.

Los resultados (Fig. 3) muestran que la presencia de TBA1 y el oligonucleótido antisentido no cambia la elasticidad del coágulo, una de sus propiedades físicas más importantes.

Ejemplo 5: Efecto del oligonucleótido antisentido sobre la tasa de reversibilidad de inhibición

Se evaluó la velocidad a la que el oligonucleótido antisentido invierte el efecto inhibitorio de TBA1. Con este fin, la trombina se diluyó a 10 UI/ml (~0,1 uM) para el ensayo de actividad de trombina y se añadió TBA1 a 5, o 25 µM (lo que resulta en una relación de trombina TBA1 50:1 o 250:1, respectivamente). Todas las concentraciones son concentraciones finales dentro de la muestra de trombina. El ensayo de actividad de trombina se inició mediante la adición de un componente de fibrinógeno que incluye una cantidad equimolar de los oligonucleótidos antisentido.

Se agregaron cuatro (4) volúmenes de solución de fibrinógeno que contenía AS a un volumen de solución de trombina, de modo que la concentración final de TBA1 en las soluciones de trombina que contenían TBA1 de 5 y 25 µM fue de 1 y 5 µM, respectivamente, y la trombina fue de 2 UI/ml (o ~0,02µM). Las relaciones TBA1/trombina se mantuvieron sin cambios. Para evaluar el posible efecto inhibitorio de los oligonucleótidos antisentido, se incluyó un control que contenía antisentido solo (sin TBA1).

La actividad de la trombina en este ensayo se midió como el tiempo requerido para que la trombina coagule el fibrinógeno. Por lo tanto, el 100% de actividad extrapolada indicaría que la inhibición de TBA1 fue neutralizada por los oligonucleótidos antisentido en un tiempo constante que es más rápido que la sensibilidad del ensayo (1/10º de segundo). Se agregaron oligonucleótidos antisentido en un rango entre 1/10º y 8 veces mayor que el TBA1, para superar la tasa de unión posiblemente demasiado lenta entre los dos componentes. Como se puede ver en la Figura 4, a la concentración final de TBA1 1 µM (4A) así como a 5 µM (4B), hubo un retraso en la reacción de coagulación, incluso cuando el oligonucleótido antisentido se agregó a la solución de fibrinógeno en gran exceso en comparación con TBA. En conjunto, aparentemente el poco tiempo disponible para la neutralización de TBA1 con el oligonucleótido antisentido cuando se agrega al componente fibrinógeno no es lo suficientemente largo como para neutralizar de manera eficiente la inhibición de la trombina mediada por TBA-1.

La relación molar entre TBA1:trombina también pareció tener un efecto en la reacción (50:1 o 250:1 TBA1 la relación de trombina resultó en una recuperación del 70% y 60%, respectivamente). Si bien la adición de un exceso de antisentido de 5:1 (antisentido: TBA1) pareció mejorar la tasa de neutralización de TBA1 en la reacción realizada a concentraciones más bajas de TBA1 (antisentido de 5 µM:TBA1 1 µM, Fig. 4A), un exceso 4:1 u 8:1 no provocó una mayor recuperación de la actividad de la trombina cuando el ensayo se realizó a mayores concentraciones de TBA1 (antisentido de 20 y 40 µM: 5 µM de TBA1, respectivamente, Fig. 4B). finalmente, el oligonucleótido antisentido agregado a la trombina sin TBA1 también causó una reducción pequeña pero detectable en la actividad de la trombina (Fig. 4 A y B).

Ejemplo 6: Inversión incompleta del exceso de actividad de trombina inhibida por TBA en exceso con oligonucleótidos antisentido

Los datos representados en la Figura 1 mostraron que la inhibición de la trombina por TBA es completamente reversible. La inversión rápida es un atributo clave para cualquier inhibidor reversible que se use en una mezcla de sellador de fibrina.

Para probar el tiempo necesario para la reversión completa de la inhibición de la trombina por TBA1, examinamos el tiempo real requerido para la reversión eficiente de TBA1 agregado en exceso. Se agregaron 25 µM de TBA1 a 10 UI/ml (0,1 µM) de trombina, una concentración que se puede probar directamente en el ensayo de actividad de trombina. Esto representa una relación de trombina TBA1 de 250:1. Se añadió oligonucleótido antisentido

en una cantidad equimolar a TBA1 (25 μ M) en el tiempo 0, y las muestras se analizaron usando el ensayo de coagulación de trombina en varios puntos de tiempo posteriores (la mezcla de trombina: TBA1: antisentido se diluyó en la cubeta de reacción para que el molar la relación entre ellos no cambia). Este ensayo también se realizó para TBA2 con un oligonucleótido antisentido correspondiente. Los resultados mostraron que si bien la actividad de la trombina medida después de 60 segundos es de aproximadamente 7 UI/ml (aproximadamente 70%), no hubo mejoría después de 600 segundos, y la actividad no se recuperó completamente después de 1800 segundos (Fig. 5). Contrarrestar TBA2 con antisentido fue incluso menos eficiente (Fig. 5). Sorprendentemente, un gran exceso de TBA sobre la trombina no se puede neutralizar eficientemente con oligonucleótidos antisentido, incluso después de largas incubaciones.

Ejemplo 7: Prueba de caída con TBA1

Sin desear limitarse a la teoría, dos factores pueden contribuir a la tasa de eliminación de la inhibición por TBA1 de la trombina por el oligonucleótido antisentido: la concentración absoluta de TBA y la relación molar entre TBA y trombina. Se probó el efecto de aumentar la concentración de trombina, mientras se mantiene TBA1 en el rango efectivo de estabilización (~5-25 μ M), cambiando así la relación molar entre trombina y TBA1. El ensayo de coagulación de trombina no se puede realizar a las concentraciones de trombina utilizadas en los selladores de fibrina, ya que la coagulación es demasiado rápida para medirse. Por lo tanto, se utilizó el ensayo de prueba de caída, que se realiza con 200 UI/ml de trombina (~2 μ M). Este ensayo también es, esencialmente, un ensayo cinético. El fibrinógeno no polimerizado es líquido y se desliza por una pendiente inclinada, y la velocidad de polimerización de fibrinógeno inducida por la trombina determina el tiempo requerido para que la mezcla coagule y, en consecuencia, deje de moverse. Este ensayo se realizó de dos maneras. Primero, se añadió TBA1 al componente de trombina y oligonucleótidos antisentido al componente de fibrinógeno (BAC2). El tiempo de interacción proporcionado a los dos componentes es muy corto: desde el momento en que ambas mezclas se expresan desde la punta común y hasta que la mezcla se polimeriza. En estas condiciones, el oligonucleótido antisentido no neutralizó suficientemente TBA1, y la distancia recorrida por la mezcla fue casi el doble que la del control. La duplicación de la concentración antisentido no mejoró la tasa de interacción (véase la Figura 6, control sin TBA1, izquierda bar vs. 2° y 3° bar). En el segundo conjunto de experimentos, se añadió TBA1 al componente de trombina, y posteriormente se añadió el oligonucleótido antisentido y se incubó previamente durante varios minutos (5-30). Aquí, las relaciones molares entre TBA1 y trombina fueron críticas. Al 12,5: relación molar 1 (25 μ M TBA1: ~2 μ M trombina), hubo una clara reducción de la distancia recorrida por el coágulo en comparación con la prueba anterior (Fig 6, comparar los 2° y 3° bar a la 5° bar). Sorprendentemente, tras la reducción de la relación molar de la trombina TBA1 a la utilizada efectivamente en los experimentos de estabilización de la trombina (Fig. 2), 2,5:1 (5 μ M TBA1: ~2 μ M trombina), no se observaron diferencias significativas con respecto al control (Figura 6, 1° vs. 4° bar).

Estos resultados demostraron que la relación de trombina TBA1 afecta la reversibilidad de la inhibición de TBA1 por el oligonucleótido antisentido.

En una prueba de caída modificada, 1000 UI/ml de trombina se estabilizaron efectivamente con 25 μ M de TBA1 (Fig. 2). La neutralización rápida de TBA1 es un requisito de un sellador de fibrina. Para probar esto en entornos de la vida real, el ensayo de prueba de caída se modificó para incluir trombina sin diluir (1000 UI/ml) con 25 μ M de TBA1. Se añadió oligonucleótido antisentido al compartimento de trombina/TBA1 justo antes del inicio de la prueba. Esto retrasó significativamente la formación de coágulos (Fig. 7) en comparación con el control, la trombina no inhibida. Se repitió la misma prueba, pero con dos minutos de incubación del antisentido con trombina/TBA1 antes del inicio de la prueba de caída. No se observaron diferencias significativas en comparación con el control (Fig. 7).

Tomados en conjunto, cuando se usó TBA1 con trombina, a concentraciones que estabilizan eficazmente la trombina, el antisentido fue eficaz para contrarrestar la inhibición de la trombina, siempre que se añadiera a la trombina ~2 minutos antes de la prueba del sellador, un marco de tiempo aceptable para el uso clínico práctico.

Los resultados de la prueba de caída, usando las concentraciones reales de trombina del producto farmacológico y las concentraciones de TBA1 que se ha demostrado que estabilizan de manera eficiente la actividad de la trombina, indicaron que los pocos minutos necesarios para preparar la formulación para su uso son suficientes para permitir la neutralización efectiva de TBA1 con oligonucleótido antisentido.

Ejemplo 8: Prueba preclínica de trombina estabilizada reversiblemente

Para evaluar el uso de las formulaciones divulgadas en un entorno preclínico, se evaluó la capacidad del EVICEL® estabilizado (un sellador de fibrina típico) para detener el sangrado en el modelo de riñón de rata heparinizado (Macromol Biosci. 2010 11 de enero; 10 (1):33-9. doi: 10.1002/mabi.200900129. Hemostatic efficacy of biological self-assembling peptide nanofibers in a rat kidney model. Song HI, Zhang L, Zhao X.). En este modelo, se extrajo un riñón de una rata anestesiada y se sujetó la arteria principal. Se realizó un corte transversal a través de toda la sección transversal del riñón y se aplicó sellador de fibrina. Luego se soltó la pinza y se evaluó la eficiencia de la composición hemostática por la cantidad de sangre perdida a través de la superficie del riñón. Para prevenir la hemostasia endógena, las ratas fueron preinyectadas con 300 UI/kg de peso corporal de heparina. EVICEL® (Fig. 8, control) vs. EVICEL® en donde el componente de trombina se inhibió con 25 μ M de TBA1, y luego se puso en contacto

con la misma cantidad de oligonucleótido antisentido justo antes de la aplicación (Fig. 8, prueba). El tiempo transcurrido entre la aplicación de los oligonucleótidos antisentido y la pulverización real del sellador de fibrina (el tiempo requerido para ensamblar la jeringa de dos componentes EVICEL® y la punta de pulverización) es de aproximadamente 2 minutos. Como se puede ver en la Figura 8, el grupo de prueba fue al menos tan eficiente como el grupo de control para lograr la hemostasia.

Ejemplo 9: Inversión de la actividad de trombina inhibida por TBA con oligonucleótidos antisentido biotinilados de estreptavidina-sefarosa inmovilizados

Para examinar la reversión del efecto inhibitorio de la trombina de TBA1 por oligonucleótidos antisentido inmovilizados, se sintetizó un derivado biotinilado (Btn) 5' de TBA1 (AS) antisentido ([Btn]AS). La resina de estreptavidina-sefarosa se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (código de producto GE 17-5113-01; que tiene una capacidad de unión que es biotina >300 nmol/ml de medio). Brevemente, se fijaron 100 nmol de [Btn]AS para que se unieran a 1 ml de perlas de estreptavidina-sefarosa sedimentadas (tamaño de partícula medio 34 µm), que representa un mínimo de 3 veces el exceso de estreptavidina a biotina sobre el [Btn]AS, durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción de unión se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante en el tampón de reacción: fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5. Se formó un complejo Sefarosa-Estreptavidina/[Btn]AS (Beads-[Btn]AS). El complejo se sedimentó mediante centrifugado de 1 min a aproximadamente 5000 g, se decantó el sobrenadante. El lavado se realizó tres veces (en tampón de reacción). El complejo perlas-[Btn]AS se resuspendió con tampón de reacción a una suspensión al 5% (v/v).

Para establecer una línea base para el experimento, se mezclaron 10 µl de 1000 UI/ml de trombina con 0, 0,1, 0,2, 0,5 y 1 µM de TBA1 en un volumen final de 1 ml. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se determinó que la actividad de la trombina era de 10,99 y 2,38 UI/ml con 0 o 1 µM de TBA1, respectivamente (Fig. 9A). Para determinar el alcance de la inhibición de la inversión, se agregaron cantidades equimolares de antisentido en {[Btn]AS} o {perlas-[Btn]AS} a las mezclas de línea base preincubadas de trombina y TBA1, la actividad de la trombina se analizó después de 15 min incubación a temperatura ambiente. La reversión de la inhibición de TBA1 por {[Btn]AS} o {perlas-[Btn]AS} fue igual e incompleta (Fig. 9A)-la actividad de la trombina aumentó de 6,71 UI/ml (sin AS) a 9,08 UI/ml o 8,84 UI/ml para 0,1 µM TBA1/AS en lugar de 10,71 UI/ml sin TBA1 (Fig. 1) y aumentó de 2,38 UI/ml (sin AS) a 5,9 UI/ml o 5,76 UI/ml para 1 µM TBA1/AS en lugar de 10,26 UI/ml sin TBA1 (Fig. 1). La Figura 1 se usó como referencia para el nivel de inhibición de TBA1 + AS.

Sin estar atados por el mecanismo, no se obtuvo la reversión completa de la inhibición, muy probablemente debido al impedimento estérico. La adición de una secuencia enlazadora puede permitir la unión óptima del nucleótido antisentido a TBA1.

Para probar posibles artefactos de perlas solas en la actividad de trombina, se mezclaron 200 microlitros de perlas (suspensión al 5%) y 10 µl de trombina 1000 UI/ml con tampón de dilución de trombina (dihidrato de citrato de sodio al 0,4%, NaCl al 0,9%, BSA al 1%) hasta un volumen final de 1 ml. La actividad de trombina ensayada después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente fue de 10,99 UI/ml.

Para probar posibles artefactos de [Btn]AS en la actividad de trombina, se mezclaron 50 microlitros de [Btn]AS (20 µM) y 10 µl de trombina 1000 UI/ml con un tampón de dilución de trombina hasta un volumen final de 1 ml. La actividad de trombina ensayada después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente fue de 10,58 UI/ml.

Para probar posibles artefactos de perlas-[Btn]AS en la actividad de trombina, se mezclaron 200 microlitros de perlas-[Btn]AS (suspensión al 5%) y 10 µl de trombina 1000 UI/ml con tampón de dilución de trombina hasta un volumen final de 1 ml. La actividad de trombina ensayada después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente fue de 10,34 UI/ml.

Los resultados muestran que las perlas, perlas-[Btn]AS y [Btn]AS no afectan la actividad de la trombina.

Para establecer la cinética de la reversión del efecto inhibitorio de las cantidades equimolares de TBA1 de perlas-[Btn]AS se agregaron a las mezclas de línea base preincubadas después de 2, 5, 10 y 15 min. Las mezclas se probaron inmediatamente, después de la adición de AS, para determinar la actividad de la trombina. Se observó una inversión máxima de la inhibición después de 10 y 15 minutos para 0,1 o 0,2 y 0,5 o 1 µM de TBA1, respectivamente (Fig. 9B). La inhibición de la trombina y el tiempo de reactivación se pueden optimizar según sea necesario, dependiendo del uso previsto.

Los datos recogidos de los experimentos descritos anteriormente muestran que los oligonucleótidos de unión a trombina (p. ej., aptámeros) funcionan como estabilizadores eficientes de trombina altamente concentrada y purificada en formulación líquida. Su concentración preferiblemente cae dentro de un rango definido de relaciones molares en comparación con la trombina. La reversión de los TBA es posible y eficiente, siempre que la relación molar de TBA:trombina no exceda de 10:1, y es preferiblemente de aproximadamente 2,5:1 a aproximadamente 4:1. La cantidad de oligonucleótidos antisentido usados para contrarrestar el TBA preferiblemente no excede la cantidad de TBA en más de -20%, de modo que la concentración de oligonucleótidos antisentido libre no exceda ~ 5 µM, lo que

se muestra aquí también inhibe la actividad de la trombina en el fibrinógeno en un ensayo de coagulación. En estas condiciones, el tiempo requerido para contrarrestar la TBA eficiente es <2 minutos, que es aproximadamente el tiempo requerido en la clínica/cirugía para ensamblar y colocar el dispositivo para la aplicación. Por lo tanto, esta invención representa un medio aplicable para estabilizar eficientemente la trombina altamente purificada en la formulación líquida, de manera reversible, sin toxicidad o inmunogenicidad esperadas.

Aunque se han descrito varias realizaciones en este documento, se pueden implementar muchas modificaciones y variaciones a esas realizaciones. Además, cuando se divulgan materiales para ciertos componentes, se pueden usar otros materiales. La descripción anterior y las siguientes reivindicaciones están destinadas a cubrir todas las modificaciones y variaciones.

La cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se interpretará como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la invención.

Los títulos de las secciones se usan en este documento para facilitar la comprensión de la especificación y no deben interpretarse como necesariamente limitantes.

Listado de secuencias

- 20 <110> omrix Biopharmaceuticals Ltd.
PILPEL, Yair
DORON, Sivan
ZHERDEV, Yuri
BYK TENNENBAUM, Tamara
- 25 <120> TROMBINA ESTABILIZADA
- <130> ETH5800WOPCT
- 30 <160> 12
- <170> Patentin versión 3.5
- 35 <210> 1
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> oligonucleótido de unión a trombina
- <400> 1
ggttggtgtg gttgg 15
- 45 <210> 2
<211> 19
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL
- 50 <220>
<223> oligonucleótido de unión a trombina
- <400> 2
gggtgggtg tgggtggg 19
- 55 <210> 3
<211> 29
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL
- 60 <220>
<223> oligonucleótido de unión a trombina
- <400> 3
agtccgtggt agggcagggt ggggtgact 29
- 65

5
 <210> 4
 <211> 15
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> oligonucleótido de unión a trombina

10
 <400> 4
 gguuggugug guugg 15

15
 <210> 5
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> oligonucleótido de unión a trombina

20
 <400> 5
 gggguugggug uggguuggg 19

25
 <210> 6
 <211> 29
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL

30
 <220>
 <223> oligonucleótido de unión a trombina

<400> 6
 aguccguggu agggcagguu ggggugacu 29

35
 <210> 7
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 7
 ccaaccacac caacc 15

45
 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 8
 cccaaccac acccaacc 19

55
 <210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

60
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

65
 <400> 9
 agtcaccca acctgccta ccacggact 29

5
<210> 10
<211> 15
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 10
ccaaccacac caacc 15

15
<210> 11
<211> 19
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

20
<400> 11
cccaaccac acccaacc 19

25
<210> 12
<211> 29
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

30
<400> 12
agucaccca accugccua ccacggacu 29

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para estabilizar la actividad de la trombina en una solución, el método comprende: inhibir la actividad de la trombina poniendo en contacto la trombina con un oligonucleótido de unión a trombina, en donde el oligonucleótido de unión a trombina es capaz de unirse a un oligonucleótido antisentido; y en donde la inhibición de la trombina por el oligonucleótido de unión a la trombina se puede revertir al poner en contacto el oligonucleótido de unión a la trombina unido a la trombina con el oligonucleótido antisentido, en donde la solución comprende una concentración de trombina igual o superior a 4 UI/ml y hasta 15.000 UI/ml de trombina
- 10 **2.** El método de la reivindicación 1, en donde la solución comprende una concentración de trombina en el intervalo de 10 UI/ml a 1000 UI/ml de trombina.
- 3.** El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el oligonucleótido de unión a trombina se une al exosito I de trombina.
- 15 **4.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el oligonucleótido de unión a trombina es un aptámero que comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1.
- 5.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la solución comprende una relación molar de 9:1 a 1:1 oligonucleótido de unión a trombina:trombina.
- 20 **6.** Una formulación de trombina para usar en aplicaciones que requieren la conversión de fibrinógeno a fibrina, la formulación comprende: trombina y un oligonucleótido de unión a trombina, en donde el oligonucleótido de unión a trombina es capaz de unir un oligonucleótido antisentido y en donde la unión del oligonucleótido de unión a trombina y la trombina se puede revertir mediante la adición del oligonucleótido antisentido a la formulación, y en donde la concentración de trombina es igual o superior a 4 UI/ml y hasta 15.000 UI/ml.
- 25 **7.** La formulación de trombina de la reivindicación 6, en donde la concentración de trombina es 20 UI/ml-15.000 UI/ml, o 100 UI/ml-5.000 UI/ml, o 300 UI/ml-1.000 UI/ml.
- 30 **8.** La formulación de trombina de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, para usar como un componente de un sellador de fibrina.
- 9.** La formulación de trombina de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la constante de disociación (Kd) entre el oligonucleótido de unión a trombina y el oligonucleótido antisentido es inferior a 0,2 µM (microM).
- 35 **10.** La formulación de trombina de la reivindicación 6, en donde el oligonucleótido de unión a trombina se une al exosito I de trombina.
- 11.** La formulación de trombina de la reivindicación 10, en donde el oligonucleótido de unión a trombina es un aptámero que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 1.
- 40 **12.** La formulación de trombina de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, que tiene una relación molar en el intervalo 10 de oligonucleótido de unión a trombina 9:1 a 1:1: trombina.
- 45 **13.** Un kit que comprende un contenedor que comprende:
- a. una formulación de trombina como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12
- b. un recipiente que comprende un oligonucleótido antisentido seleccionado para unirse al oligonucleótido de unión a trombina en la formulación de trombina de las reivindicaciones 6 a 12; y
- 50 style="padding-left: 40px;">c. opcionalmente instrucciones de uso.
- 14.** El kit de la reivindicación 13, en donde el oligonucleótido antisentido está en solución.
- 55 **15.** El kit de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde el oligonucleótido antisentido está unido a una fase sólida.
- 60 **16.** El kit de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende además un recipiente que comprende fibrinógeno.

65

FIGURA 1

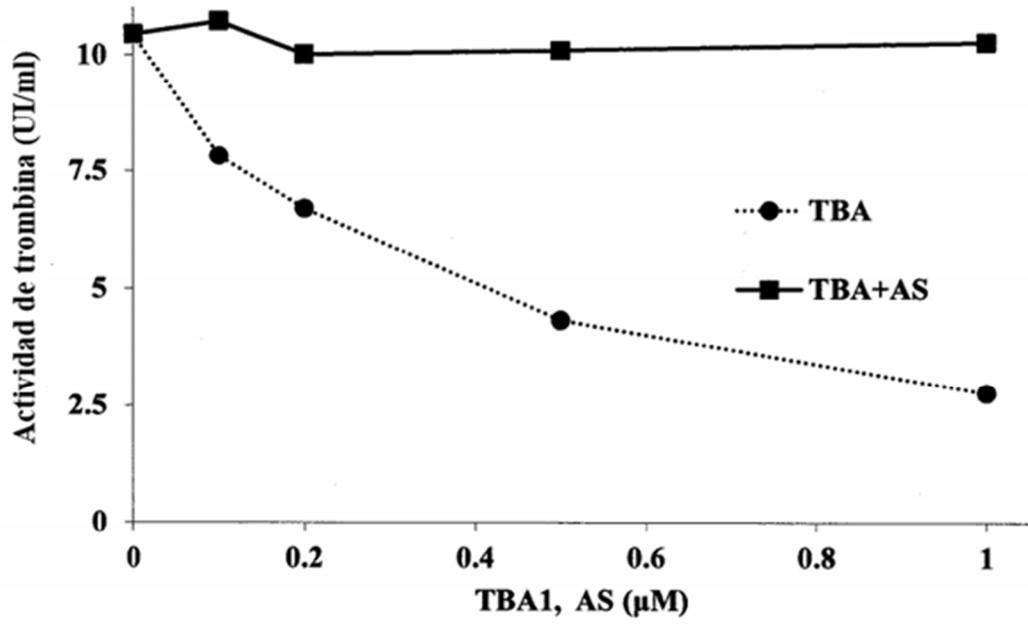


FIGURA 2A

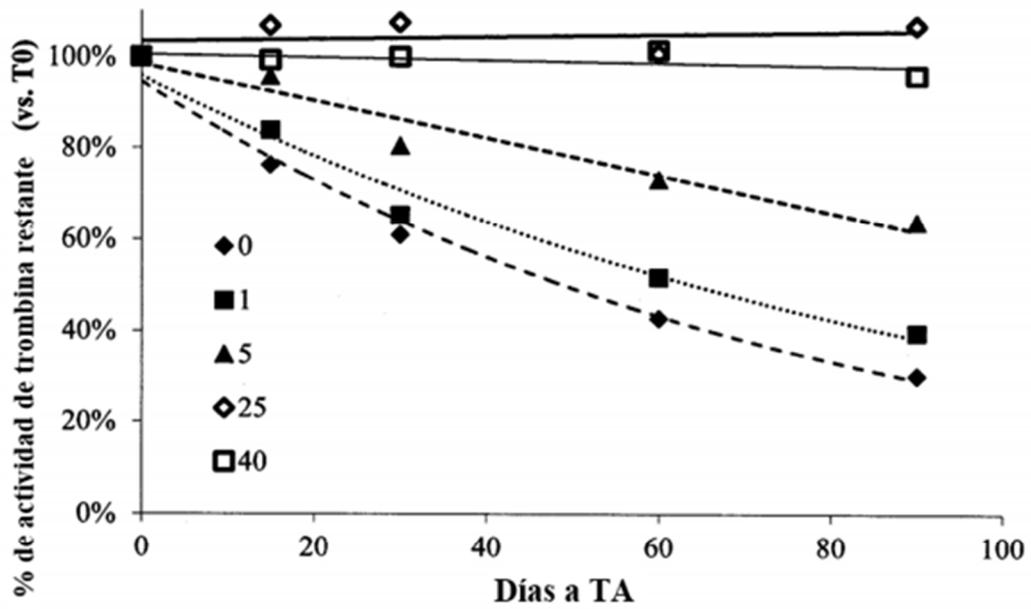


FIGURA 2B

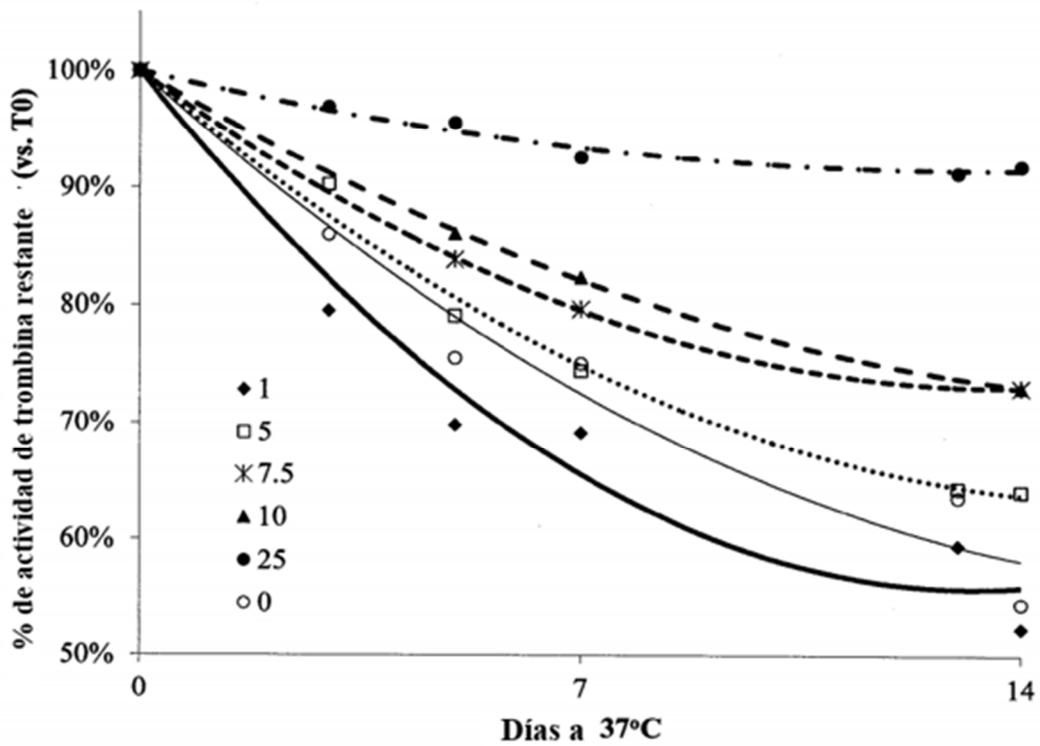


FIGURA 2C

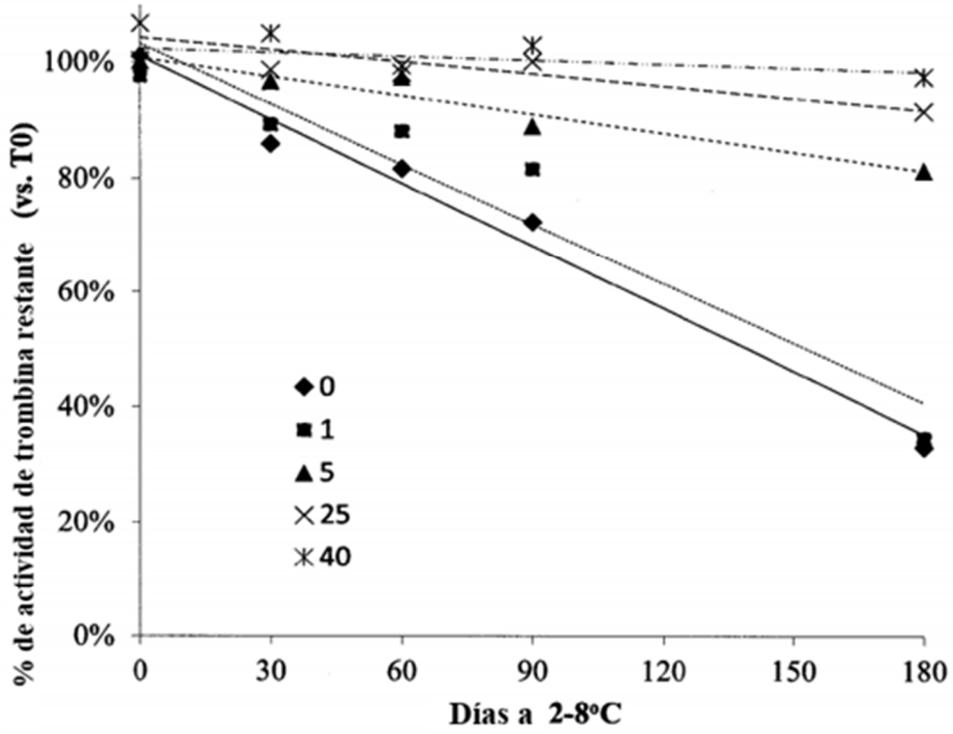


FIGURA 2D

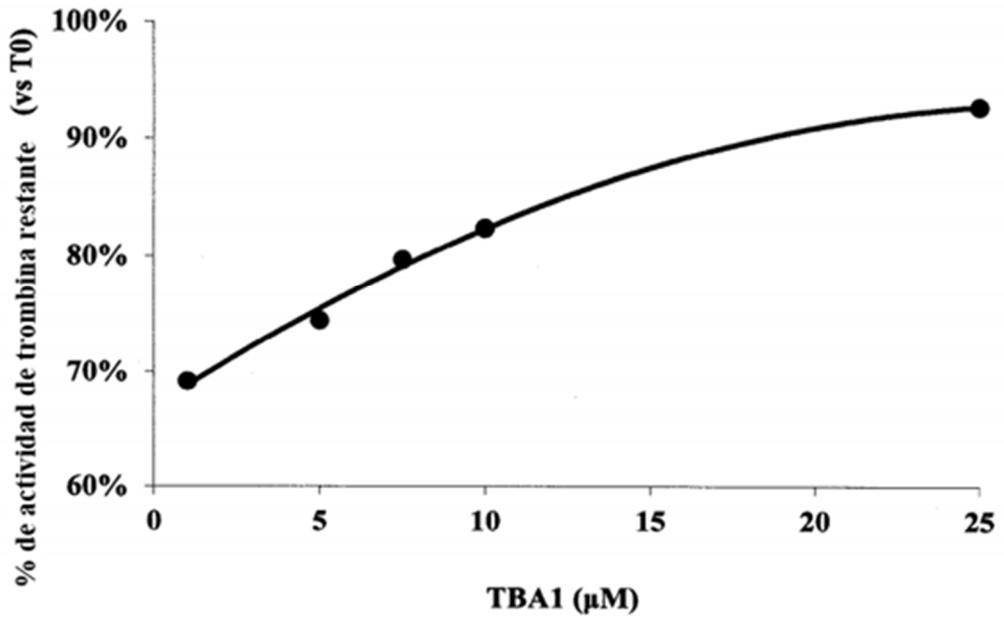


FIGURA 3

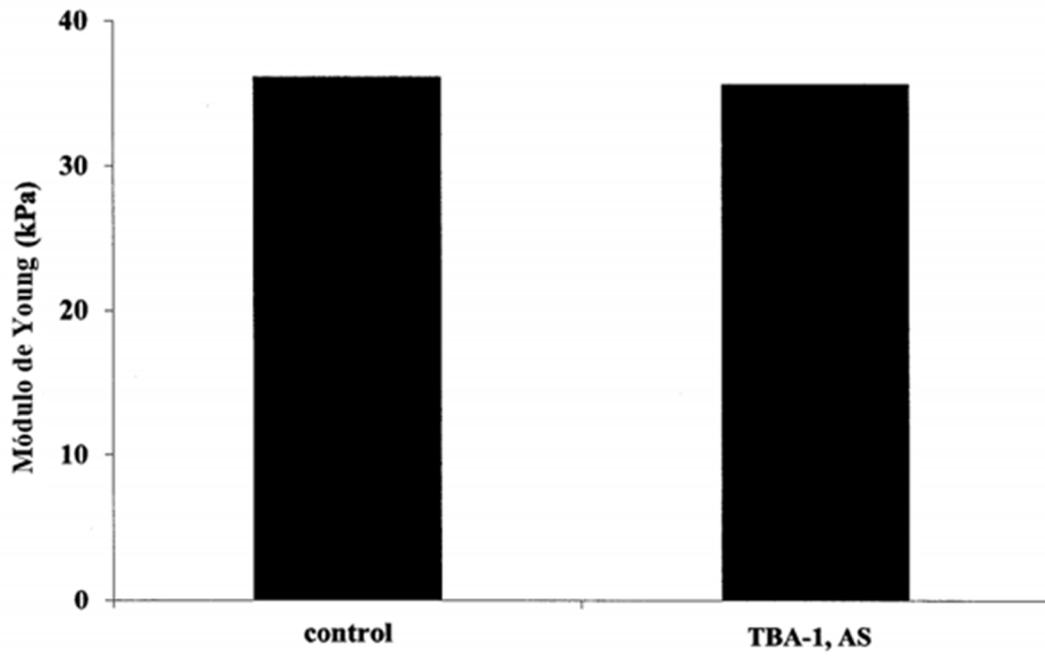


FIGURA 4A

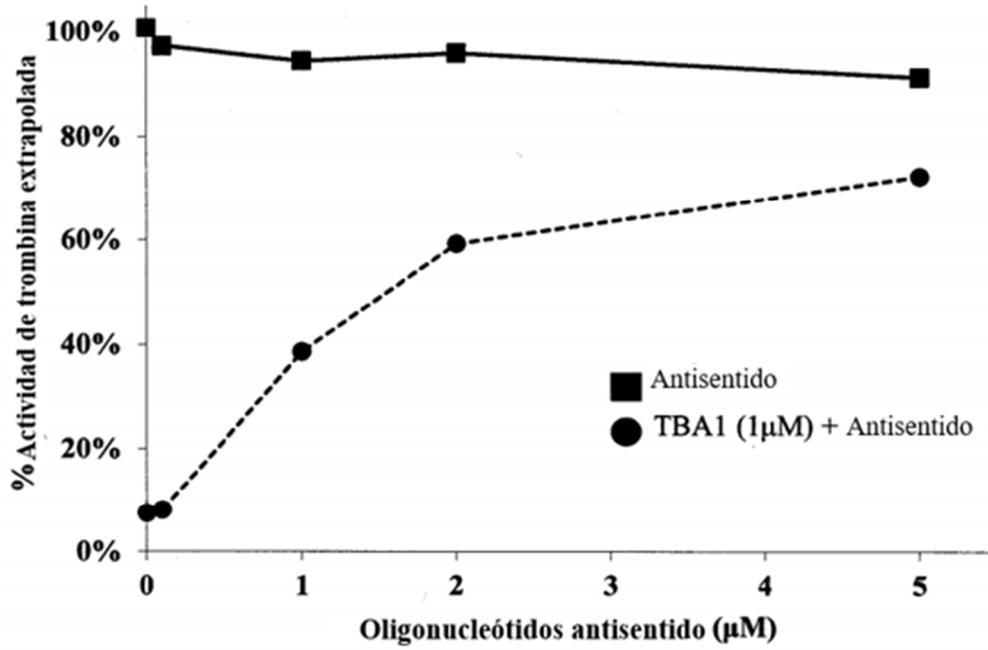


FIGURA 4B

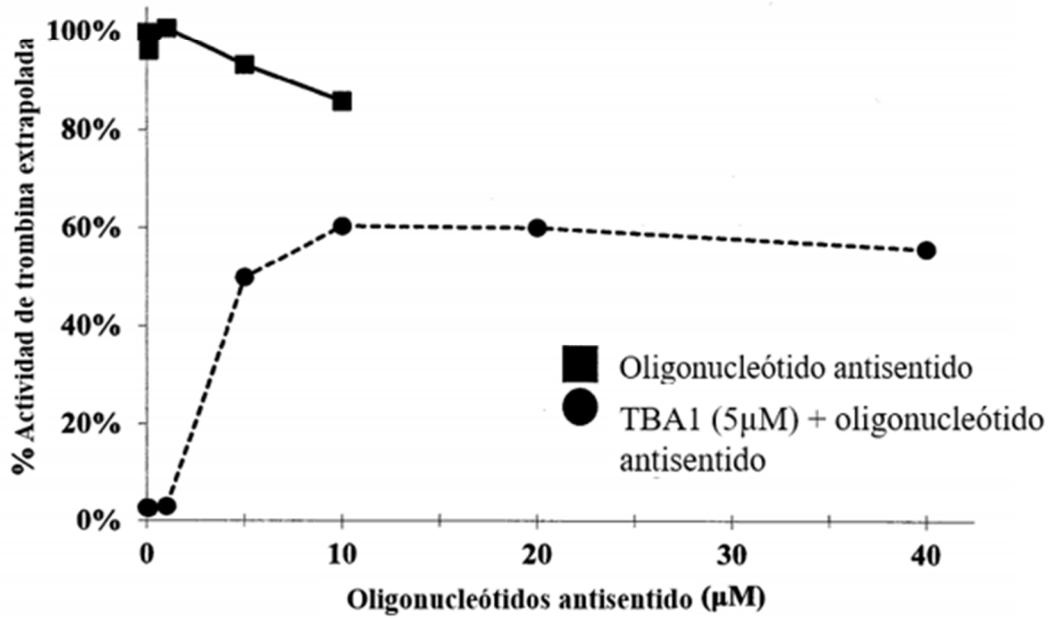


FIGURA 5

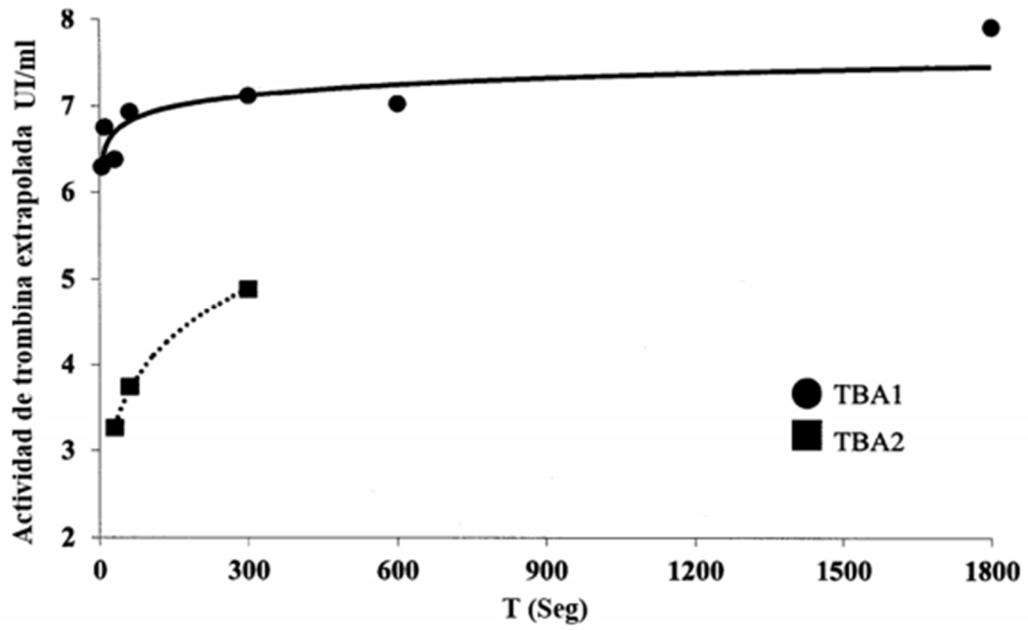


FIGURA 6

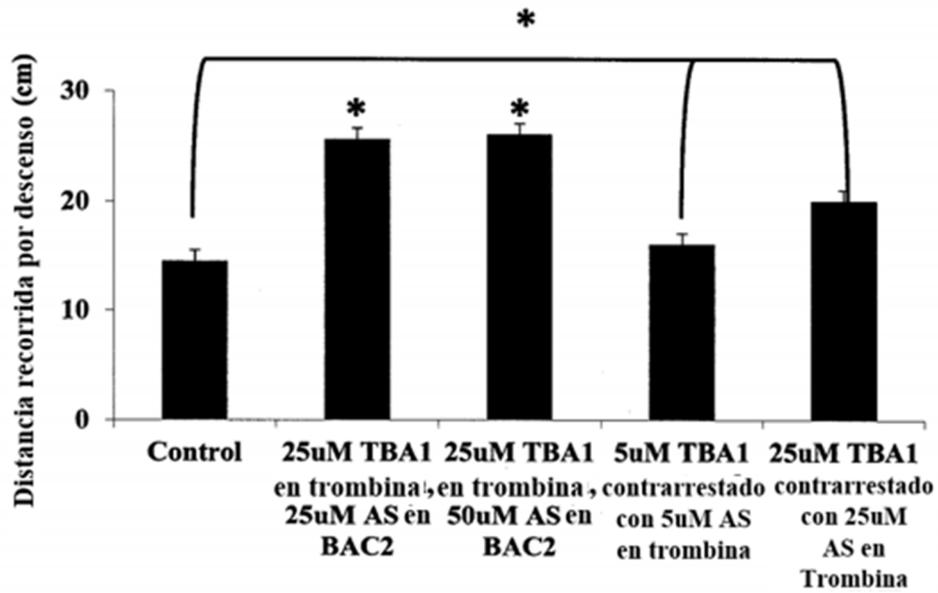


FIGURA 7

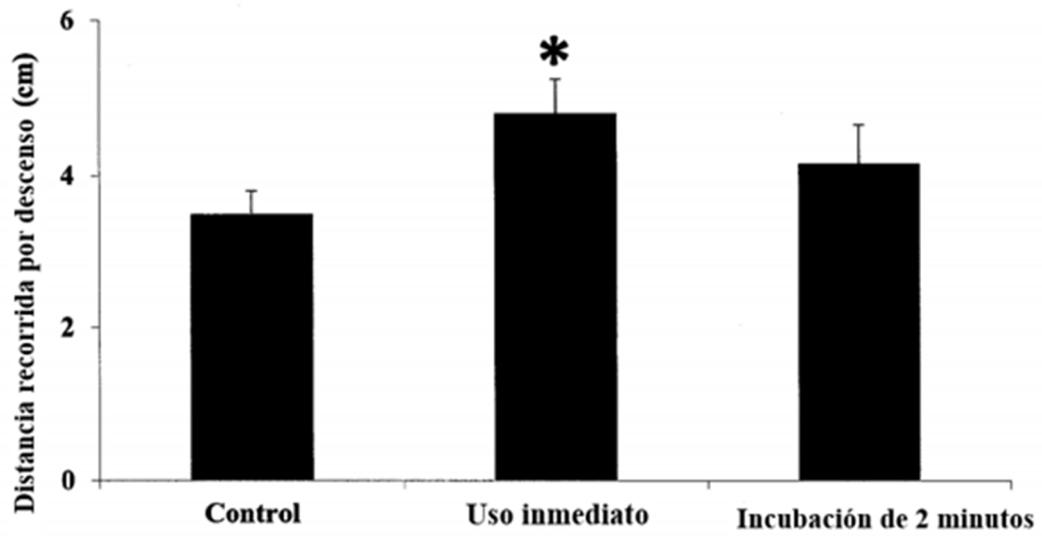


FIGURA 8

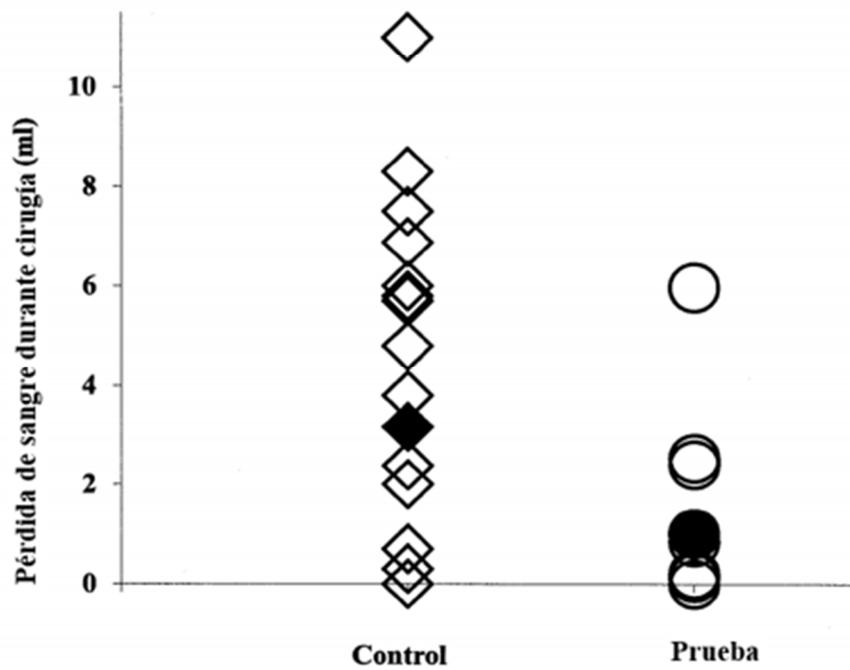


FIGURA 9A

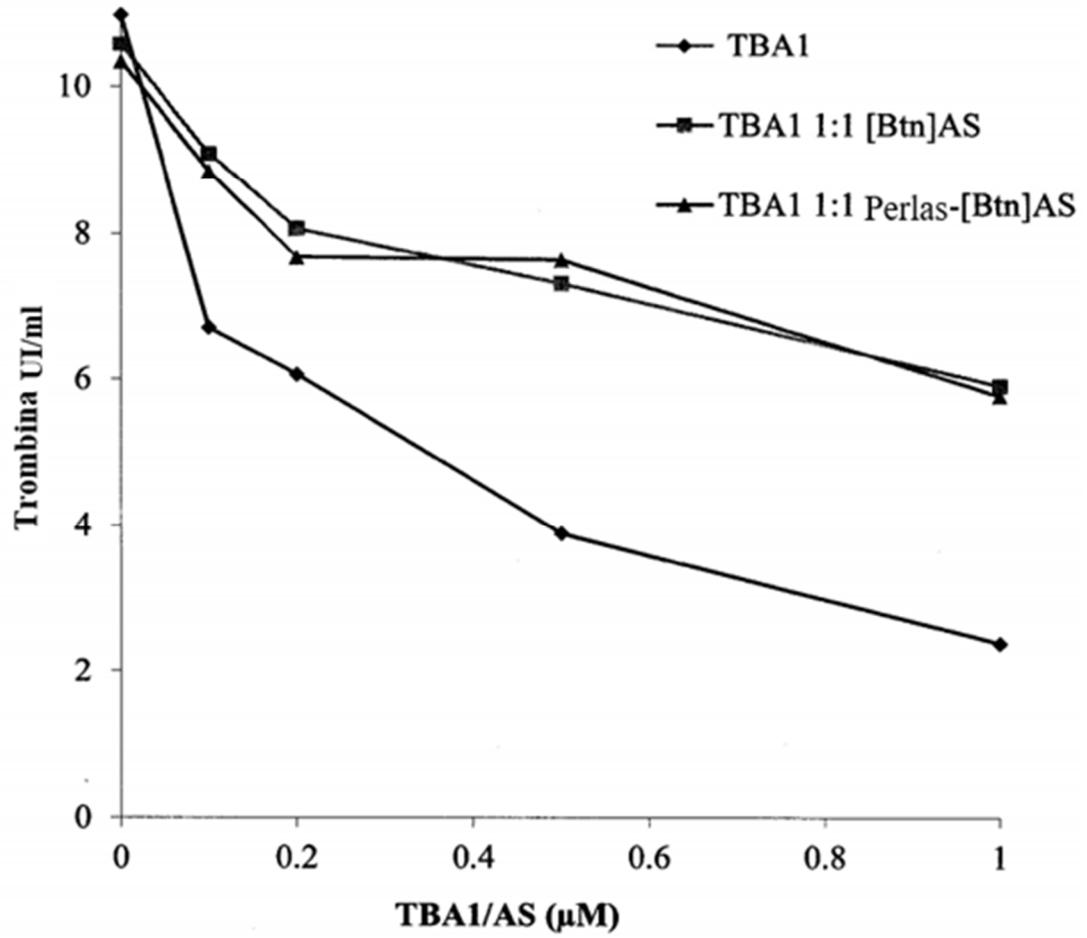


FIGURA 9B

