

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 715**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2007 E 07831829 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 2096167**

54 Título: **Aptámero contra midkina y uso del mismo**

30 Prioridad:

14.11.2006 JP 2006308482

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

08.03.2013

73 Titular/es:

**RIBOMIC INC (100.0%)
16-13, SHIROKANEDAI 3-CHOME MINATO-KU
TOKYO 108-0071, JP**

72 Inventor/es:

**MIYAKAWA, SHIN;
FUJIWARA, MASATOSHI;
NAKAMURA, YOSHIKAZU;
MATSUI, TAKASHI y
SAKUMA, SADATOSHI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 715 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

Aptámero contra midkina y uso del mismo.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un aptámero contra midkina, a un método para utilizarlo y similares.

5 Antecedentes de la invención

La midkina (en lo sucesivo abreviada "MK" según sea necesario) es un factor de crecimiento/diferenciación que se descubrió primero como un producto génico expresado transitoriamente en el proceso de inducción de diferenciación de células tumorales embrionarias (EC) con ácido retinoico, siendo un polipéptido que tiene un peso molecular de 13kDa, rico en aminoácidos básicos y cisteína (véanse, por ejemplo, el documento no patente 1 y el documento no de patente 2).

La estructura estérica de MK ha sido determinada por RMN y ha sido descrita (véase, por ejemplo, el documento no de patente 3). Cuando se caracteriza estructuralmente, la MK se configura principalmente con dos dominios. Específicamente, la MK consiste en un fragmento en el lado N-terminal que consiste en los residuos de aminoácidos 1 a 52 (en lo sucesivo denominado "el fragmento N-terminal"), un fragmento en el lado C-terminal que consiste en los residuos de aminoácidos 62 a 121 (en lo sucesivo denominado "el fragmento C-terminal") y una región de bucle que conecta los fragmentos (residuos de aminoácidos 53 a 61). Unido a la parte externa de cada dominio hay un extremo rico en aminoácidos básicos. En la molécula de MK, cada fragmento N-terminal y cada fragmento C-terminal tiene una estructura estérica que consiste principalmente en tres estructuras de lámina β invertidas (en lo sucesivo denominadas "dominios"; un dominio que consiste en los residuos de aminoácidos 15 a 52 en el fragmento N-terminal denominado "el dominio N", un dominio que consiste en los residuos de aminoácidos 62 a 104 en el fragmento C-terminal denominado "el dominio C"), y estructuras que se mueven libremente y que no asumen ninguna estructura en particular (en lo sucesivo denominadas "colas"; una cola que consiste en los residuos de aminoácidos 1 a 14 en el fragmento N-terminal denominada "cola N" y una cola que consiste en los residuos de aminoácidos 105-121 en el fragmento C-terminal denominada "cola C").

Los receptores de MK conocidos incluyen la proteína tirosina fosfatasa ζ (PTP ζ) de tipo receptora, LRP (proteína relacionada con los receptores de lipoproteína de baja densidad), ALK (leucemia cinasa anaplásica), integrina y syndecan, y similares. La MK es una proteína alta y positivamente cargada que contiene grandes cantidades de los aminoácidos básicos lisina (K) y arginina (R). Tiene un sitio de unión a heparina en su dominio C, y se sabe que se une fuertemente a moléculas negativamente cargadas tales como heparina y sulfato de condroitina E. Como resultado del análisis de mutagénesis y del análisis de RMN, se cree que el grupo I, configurado con K79, R81 y K102, y el grupo II, configurado con K86, K87 y R89, son importantes para la unión con heparina. Mientras tanto, existe un informe que indica que solamente el grupo I es importante para la unión con sulfato de condroitina E. Cuando R81 del grupo I se reemplaza con A, se reduce la actividad de unión con heparina. En consecuencia, se suprimen la reducción de la actividad de unión a PTP ζ y la extensión y el movimiento de neuritas inducidos por MK.

Algunos factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF) poseen un sitio de unión a heparina. Se cree que estos factores de crecimiento se unen a proteoglicano de heparán sulfato, una matriz extracelular, permanecen en las posiciones apropiadas y son liberados según sea necesario. También se sabe que los mismos se unen a heparán sulfato expresado en las células nerviosas y en células endoteliales vasculares para contribuir a la actividad fibrinolítica y de extensión de neuritas. Cuando se recubre una placa Petri con MK y se siembran allí células nerviosas de embrión de ratón, se extienden las neuritas. En esta situación, la digestión de las células nerviosas con heparitinasa suprime la extensión de neuritas. Mientras tanto, cuando las células endoteliales vasculares se cultivan y se añade MK, la actividad del activador de plasminógeno de las células se eleva. En este caso también la digestión de las células con heparitinasa suprime la elevación de la actividad del plasminógeno.

Se cree que la MK se une a PTP ζ en dos sitios. Un sitio implica un enlace de gran afinidad con sulfato de condroitina (Kd = 0,58 nM). Est enlace desaparece tras la digestión con condroitinasa. El otro sitio implica un enlace con proteína, siendo un enlace de baja afinidad que permanece después de la digestión con condroitinasa (Kd = 3 nM). La MK promueve la migración de células nerviosas fetales que expresan PTP ζ ; el tratamiento de células nerviosas con condroitinasa ABC suprime la migración. Las células UMR106 de tipo osteoblastos expresan PTP ζ y se sabe que su migración dependiente de MK se suprime con el tratamiento con condroitinasa ABC. La migración dependiente de MK de macrófagos también se suprime con el tratamiento con condroitinasa ABC, condroitinasa B o heparinasa. Ya que no se cree que los macrófagos expresen PTP ζ , se cree que está implicado otro receptor.

De cualquier forma, la carga negativa no se une al sitio de unión a heparina de MK. Cuando se inmovilizó MK por aminoacoplamiento y se sometió a análisis por resonancia de plasmones, los resultados obtenidos demostraron que el sulfato de condroitina E y la heparina se unieron fuertemente a MK, mientras que los sulfatos de condroitina A, B, C y D no se unieron a ésta.

Se sabe que la MK posee un amplio espectro de actividades biológicas. Por ejemplo, se sabe que en células

cancerosas humanas, aumenta la expresión de MK. Este aumento de expresión se ha observado en una amplia variedad de tipos de cáncer, incluidos cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga urinaria, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de tórax, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de mama, neuroblastoma, glioblastoma, cáncer uterino, cáncer de ovario y tumor de Wilms (véanse, por ejemplo, el documento de patente 1 y el documento no de patente 4). También se cree que la MK promueve la supervivencia y el movimiento de células cancerosas y facilita la neovascularización para ayudar al avance del cáncer.

También se sabe que la MK es una de las moléculas que cumplen una función central en el proceso de desarrollo de la inflamación.

Por ejemplo, se sabe que la formación de íntima naciente tras daño a los vasos sanguíneos y el inicio de nefritis en lesión isquémica se mitigan en ratones con genes inactivados que carecen del gen de MK. También se sabe que en un modelo de reumatismo, la adhesión posoperatoria también se mitiga en gran medida en ratones con genes inactivados de MK (véanse, por ejemplo, el documento de patente 2, el documento de patente 3 y el documento de patente 4). En consecuencia, se sabe que la MK está implicada en enfermedades inflamatorias tales como artritis, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumática (artritis reumatoidea (RA), artrosis (OA)), esclerosis múltiple, adhesión posoperatoria, colitis inflamatoria, psoriasis, lupus, asma y anomalías funcionales de los neutrófilos. Asimismo, se sabe que la MK promueve el movimiento (migración) de células inflamatorias tales como macrófagos y neutrófilos. Ya que este movimiento es necesario para el desarrollo de inflamación, se cree que cuando se carece de midkina, es poco probable que se manifiesten enfermedades inflamatorias. (Véase, por ejemplo, el documento de patente 5).

Dado que los niveles de MK aumentan en el fluido peritoneal de mujeres con endometriosis avanzada, y también dado que la MK estimula la proliferación de células intersticiales endometriales cultivadas, se sabe que la MK está implicada en el inicio y el avance de la endometriosis (véase, por ejemplo, el documento de patente 6).

Asimismo, ya que exhibe acción de engrosamiento de la íntima vascular, se sabe que la MK está implicada en enfermedades vasculares obstructivas tales como restenosis que le sigue a cirugía de reconstrucción vascular, enfermedad obstructiva vascular de las arterias coronarias, enfermedad obstructiva vascular cerebral, enfermedad obstructiva vascular renal, enfermedad obstructiva vascular periférica, arteriosclerosis e infarto cerebral (véase, por ejemplo, el documento de patente 2).

Se sabe que la migración celular es importante para los mecanismos de infiltración/metástasis de células cancerosas, engrosamiento de la íntima en focos arterioscleróticos, neovascularización y similares. También se sabe que la migración de células inflamatorias se asocia profundamente con enfermedades cardiovasculares tales como angina de pecho, infarto de miocardio, infarto cerebral, hemorragia cerebral e hipertensión.

La pleiotrofina (PTN o HB-GAM) es la única proteína de la familia de MK, que tiene aproximadamente 50% de homología con MK. Tanto MK como PTN son proteínas que contienen grandes cantidades de residuos de cisteína y básicos. Los 10 residuos de cisteína están conservados en MK y PTN, y estructuralmente, ambas pueden dividirse en el dominio N y en el dominio C. Como resultado del análisis de RMN, se sabe que estas dos moléculas tienen estructuras tridimensionales muy similares. Cada dominio consiste en tres láminas β , conectadas mediante una región enlazadora. K79, R81 y K102, consideradas importantes para la unión con sulfato de condroitina y heparina, están conservadas entre las dos proteínas. K79 y R81 están presentes en la misma lámina β , mientras que K102 está presente en otra lámina β . Cuando MK y PTN forman una estructura estérica, estos residuos básicos aparecen próximos a la superficie de la proteína.

En los últimos años, las aplicaciones de aptámeros de RNA a fármacos terapéuticos, reactivos diagnósticos y reactivos de prueba han llamado la atención; algunos aptámeros de RNA ya han estado en fase clínica o en fase práctica. En diciembre de 2004, se aprobó el primer fármaco mundial de aptámero de RNA, Macugen, como fármaco terapéutico para degeneración macular relacionada con el envejecimiento en los Estados Unidos. Un aptámero de RNA se refiere a un RNA que se une específicamente a una sustancia diana tal como una proteína, y puede prepararse usando el método de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* o SELEX) (documentos no de patente 5, 6). El método SELEX es un método mediante el cual un RNA que se une específicamente a una sustancia diana se selecciona entre aproximadamente 10^{14} grupos de RNA que tienen diferentes secuencias de nucleótidos. El RNA utilizado tiene una estructura en la que una secuencia aleatoria de aproximadamente 40 residuos se intercala mediante secuencias cebadoras. Se permite asociar estos grupos de RNA con una sustancia diana, y solamente el RNA que se ha unido a la sustancia diana se recupera usando un filtro y similar. El RNA recuperado se amplifica por RT-PCR, y esto se utiliza como molde para la próxima tanda. Repitiendo esta operación aproximadamente 10 veces, puede a veces adquirirse un aptámero de RNA que se une específicamente a la sustancia diana.

[documento de patente 1] JP-A-6-172218

[documento de patente 2] WO2000/10608

[documento de patente 3] WO2004/07821

[documento de patente 4] WO2004/085642

[documento de patente 5] WO1999/03493

[documento de patente 6] WO2006/016571

[documento no de patente 1] Kadomatsu, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 151:pág.1312-1318

5 [documento no de patente 2] Tomokura, M. et al., J.Biol. Chem, 265: pág.10765-10770

[documento no de patente 3] Iwasaki, W. et al., (1997) EMBO J. 16, pág.6936-6946

[documento no de patente 4] Muramatsu, T., (2002) J. Biochem. 132, pág.359-371

[documento no de patente 5] Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-822

[documento no de patente 6] Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-510

10 **Descripción de la invención**

Problemas a resolver mediante la invención

La presente invención se refiere a proveer un aptámero para midkina y a un método para utilizarlo, y similares.

Medios para resolver los problemas

15 Los presentes inventores investigaron adecuadamente para resolver el problema anteriormente descrito, y en consecuencia, tuvieron éxito en preparar un aptámero de buena calidad para midkina, que completó la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] un aptámero que posee una actividad inhibidora contra midkina, que es o bien (a) o (b) a continuación:

20 (a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las SEC ID NÚM:1 a 2, 4 a 20, 22 a 33, 35 a 36, 39 a 64 y 66 a 70 (con la salvedad que el uracilo puede ser timina), donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que,

(i) las posiciones 2' de los nucleótidos de pirimidina, o bien idénticos o diferentes, son átomos de flúor o están sustituidas con átomos o grupos seleccionados entre el grupo que consiste en átomos de hidrógeno, grupos hidroxilo y grupos metoxi, y

25 (ii) las posiciones 2' de los nucleótidos de purina, o bien idénticos o diferentes, son grupos hidroxilo o están sustituidas por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en átomos de hidrógeno, grupos metoxi y átomos de flúor;

30 (b) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las SEC ID NÚM:1 a 2, 4 a 20, 22 a 33, 35 a 36, 39 a 64 y 66 a 70 (con la salvedad que el uracilo puede ser timina), en donde uno a tres nucleótidos son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos, en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que,

(i) las posiciones 2' de los nucleótidos de pirimidina, o bien idénticos o diferentes, son átomos de flúor o están sustituidas con átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en átomos de hidrógeno, grupos hidroxilo y grupos metoxi, y

35 (ii) las posiciones 2' de los nucleótidos de purina, o bien idénticos o diferentes, son grupos hidroxilo o están sustituidas con átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en átomos de hidrógeno, grupos metoxi y átomos de flúor,

[2] el aptámero de [1], en donde un nucleótido contenido en el aptámero se modifica,

[3] un complejo que comprende el aptámero de [1] o [2] y una sustancia funcional,

40 [4] el complejo de [3], en donde la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia para etiquetado, una enzima, un vehículo para administración de fármacos o un fármaco,

[5] un medicamento que comprende el aptámero de [1] o [2] o el complejo de [3] o [4],

[6] un inhibidor de migración celular que comprende el aptámero de [1] o [2] o el complejo de [3] o [4],

[7] un reactivo diagnóstico que comprende el aptámero de [1] o [2] o el complejo de [3] o [4],

[8] un agente de etiquetado que comprende el aptámero de [1] o [2] o el complejo de [3] o [4], y

[9] un método *in vitro* para detectar midkina utilizando el aptámero de [1] o [2] o el complejo de [3] o [4].

Efecto de la invención

5 El aptámero o el complejo de la presente invención pueden ser útiles como medicamentos o reactivos tales como reactivos diagnósticos, para diversas enfermedades tales como enfermedad autoinmunitaria, cáncer, adhesión posoperatoria y endometriosis. El aptámero o el complejo de la presente invención pueden también ser útiles para purificar y concentrar MK, y para detectar y cuantificar MK.

Breve descripción de los dibujos

10 La Fig. 1A muestra una de las dos estructuras de RNA que se indican con la SEC ID NÚM:1 pronosticada por el programa MFOLD.

La Fig. 1B muestra la otra estructura secundaria de RNA que se indica con la SEC ID NÚM:1 pronosticada por el programa MFOLD.

La Fig. 2A muestra una de las dos estructuras secundarias de RNA que se indica con la SEC ID NÚM:2 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte cercada en un cuadrado indica una región de consenso.

15 La Fig. 2B muestra la otra estructura secundaria de RNA que se indica con la SEC ID NÚM:2 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte cercada en un cuadrado indica una región de consenso.

La Fig. 3A muestra una de las dos estructuras secundarias de RNA que se indican con la SEC ID NÚM:3 pronosticada por el programa MFOLD.

20 La Fig. 3B muestra la otra estructura secundaria de RNA que se indica con la SEC ID NÚM:3 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte cercada en un cuadrado indica una región de consenso.

La Fig. 4 muestra la estructura secundaria de RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4 pronosticada por el programa MFOLD, en donde la parte cercada en un cuadrado indica una región de consenso.

La Fig. 5 muestra la estructura secundaria de RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5 pronosticada por el programa MFOLD.

25 La Fig. 6 muestra interacciones entre el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5 y midkina, y entre el RNA y la IgG1 humana (sensograma obtenido usando BIAcore 2000).

La Fig. 7 muestra la interacción entre el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4 y midkina (sensograma obtenido usando BIAcore 2000).

30 La Fig. 8 muestra la estructura secundaria de RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20 pronosticada por el programa MFOLD.

La Fig. 9 muestra la estructura secundaria de RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 pronosticada por el programa MFOLD.

Modo óptimo de realizar la invención

35 La presente invención proporciona un aptámero que posee una actividad de unión para midkina (MK). Los aptámeros de la presente invención son capaces de inhibir las actividades de MK.

Un aptámero se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una afinidad de unión hacia una molécula diana particular. El aptámero puede también inhibir la actividad de una molécula diana particular, uniéndose a la molécula diana particular. El aptámero de la presente invención puede ser un RNA, un DNA, un ácido nucleico modificado o sus mezclas. El aptámero de la presente invención puede también estar en forma lineal o circular.

40 Una actividad inhibitoria contra MK significa inhibición de cualquiera de las actividades biológicas de la MK. Como ejemplos de actividades biológicas de MK pueden mencionarse las actividades de migración para las células (p. ej., macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células de músculo de tejido liso vascular, células tumorales, osteoblastos, células nerviosas y sus células progenitoras) (Takada et al., 1997, J. Biochem. 122, 453-458, Horiba et al., 2000, J. Clin. Invest. 105, 489-495, Maeda et al., 1999, J. Biol. Chem. 274, 12474-12479, Qi et al., 2001, J. Biol. Chem. 276, 15868-15875), las actividades de promoción de proliferación y diferenciación para las células (p. ej., células tumorales, fibroblastos, queratinocitos, células nerviosas, condrocitos y sus células progenitoras) (Muramatsu y Muramatsu, 1991, Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 652-658, Muramatsu et al., 1993, Dev. Biol. 159, 392-402, Takei et al., 2001, Cancer Res. 61, 8486-8491), las actividades inhibitorias contra la proliferación y funciones de las células T reguladoras, las actividades de promoción de extensión para neuritas nerviosas, las actividades inhibitorias contra apoptosis de células (p. ej., células tumorales, células nerviosas), las actividades de inducción de

50

neovascularización para las células (p. ej., células tumorales), las actividades de inducción de formación de sinapsa para mioblastos, las actividades de promoción del sistema fibrinolítico para células endoteliales vasculares, las actividades de promoción de producción de IL-8 para células de músculo liso vascular y similares. Por ende, como ejemplos de actividades inhibitoras contra MK, pueden mencionarse las actividades inhibitoras contra estas actividades.

El aptámero de la presente invención puede poseer actividades inhibitoras contra MK derivada de cualquier mamífero. Como ejemplos de dichos mamíferos, pueden mencionarse primates (p. ej., seres humanos, monos), roedores (p. ej., ratones, ratas, cobayas), como también animales de compañía, animales domesticados y animales de trabajo (p. ej., perros, gatos, caballos, bovinos, cabras, ovejas, cerdos).

Los aptámeros de la presente invención son capaces de unirse a una porción opcionalmente elegida de MK para inhibir una actividad de la misma, por ejemplo, uniéndose al fragmento N-terminal o al fragmento C-terminal de MK, los aptámeros de la presente invención son capaces de inhibir las actividades de la MK. La secuencia de aminoácidos de MK humana se muestra con el número de acceso en GenBank BC011704, donde la proteína secretoria está configurada con 121 residuos de aminoácidos de lisina 23 a ácido aspártico 143. En general, el residuo lisina 23 se representa con el residuo de aminoácidos en la posición 1. La MK humana consiste en un fragmento N-terminal que consiste en los residuos de aminoácidos 1 a 52, un fragmento C-terminal que consiste en los residuos de aminoácidos 62 a 121 y una región de bucle que conecta los fragmentos, pero el límite del fragmento N-terminal y del fragmento C-terminal puede ser cualquier porción de bucle de MK (53-61) y no puede definirse de manera precisa.

La longitud del aptámero de la presente invención no está limitada y puede ser, por ejemplo, de no más de aproximadamente 100 nucleótidos, preferiblemente no más de aproximadamente 80 nucleótidos, más preferiblemente no más de aproximadamente 60 nucleótidos, lo más preferiblemente no más de aproximadamente 45 nucleótidos. La longitud del aptámero de la presente invención puede ser, por ejemplo, de no menos de aproximadamente 18, 20 o 25 nucleótidos. Si el número total de nucleótidos es menor, la síntesis química y la producción masiva serán más sencillas, y existe una ventaja importante en términos de coste. También se cree que la modificación química es sencilla, que la estabilidad en el cuerpo es alta y que la toxicidad es baja.

Cada uno de los nucleótidos contenidos en el aptámero de la presente invención es tal que,

(i) las posiciones 2' de los nucleótidos de pirimidina, ya sea idénticos o diferentes, son átomos de flúor o están sustituidas con átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en átomos de hidrógeno, grupos hidroxilo y grupos metoxi, y

(ii) las posiciones 2' de los nucleótidos de purina, ya sea idénticos o diferentes, son grupos hidroxilo o están sustituidas con átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en átomos de hidrógeno, grupos metoxi y átomos de flúor;

Un ejemplo de un aptámero de la presente invención puede tener una estructura secundaria potencial que comprende una o más regiones seleccionadas del grupo que consiste en regiones monocatenarias (p. ej., gggagaggaac), regiones de un primer tallo (p. ej., gacg y sus cadenas complementarias), regiones de bucle interno (p. ej., agagua y gg), regiones de segundo tallo (p. ej., gcc y sus cadenas complementarias) y regiones de bucle interno (p. ej., ggaagaa). Otro ejemplo de un aptámero de la presente invención puede tener una estructura secundaria potencial que comprende una o más regiones seleccionadas del grupo que consiste en regiones monocatenarias (p. ej., gggaaggaggaa), regiones de primer tallo (p. ej., gugcac y sus cadenas complementarias), regiones de bucle interno (p. ej., ag y gg), regiones de segundo tallo (p. ej., gg y sus cadenas complementarias) y regiones de bucle interno (p. ej., guuggug).

Tal como se utiliza en la presente memoria, "estructura secundaria potencial" se refiere a una estructura secundaria capaz de ocurrir bajo condiciones fisiológicas; por ejemplo, si una estructura secundaria potencial está o no presente puede determinarse usando los programas de predicción de estructuras descritos en los Ejemplos. Una región de tallo se refiere a una porción en la que se forma una doble cadena con un par de bases en dos o más nucleótidos continuos (p. ej., G-C, A-U, A-T). Una porción de bucle interno se refiere a una región no de tallo formada entre dos regiones de tallo distintas. Una región de bucle horquilla se refiere a una estructura parcial formada por una región de tallo, siendo una región de bucle formada en el lado opuesto al extremo 5' y al extremo 3' de una cadena de aptámero. Una región monocatenaria se refiere a una porción terminal de una cadena de polinucleótidos, siendo una región que no corresponde a la región de tallo, a la región de bucle interno o a la región de bucle horquilla anteriormente descritas.

Los aptámeros de la presente invención pueden también tener la capacidad de unirse al fragmento N-terminal y/o al fragmento C-terminal de MK. El aptámero que se muestra en la SEC ID NÚM:39 y sus formas alteradas, como heparina y sulfato de condroitina E, exhiben alta actividad de unión para el fragmento C-terminal. Se cree que la heparina se une al fragmento C-terminal en las regiones del grupo I y del grupo II. Se cree que el sulfato de condroitina E se une al fragmento C-terminal en la región del grupo I. Se sabe que la MK interactúa con PTP ζ , que comprende sulfato de condroitina como su molécula constituyente. PTP ζ se expresa en células nerviosas fetales y

en células de tipo osteoblasto, y en presencia de MK, se promueve la migración de estas células. En la presente invención, se proveen un aptámero capaz de unirse al fragmento C-terminal para inhibir la migración celular, y un aptámero que se une principalmente al fragmento N-terminal para inhibir la migración celular.

5 Los aptámeros de la presente invención son capaces de inhibir las actividades de MK (p. ej., actividad de migración celular de MK), y pueden tener la característica de ser incapaces de inhibir una actividad de PTN (p. ej., actividad de migración celular de PTN). PTN es la única proteína de la familia de MK que tiene una homología de 50%, tiene estructuras tridimensionales muy similares, y los residuos de aminoácidos importantes para la unión con sulfato de condroitina y heparina están conservados.

10 El aptámero de la presente invención es (a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de una de las SEC ID NÚM:1 a 2, 4 a 20, 22 a 33, 35 a 36, 39 a 64 y 66 a 70 (pero el uracilo puede ser timina), (b) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de una de las SEC ID NÚM:1 a 2, 4 a 20, 22 a 33, 35 a 36, 39 a 64 y 66 a 70 (pero el uracilo puede ser timina) que tiene uno a tres nucleótidos sustituidos, eliminados, insertados o añadidos, o (c) un conjugado seleccionado del grupo que consiste en un conjugado de una pluralidad de unidades de (a) anterior, un conjugado de una pluralidad de unidades de (b) anterior
15 y un conjugado de una pluralidad de unidades de (a) y (b) anteriores. En (b) precedentemente mencionado, el número de nucleótidos sustituidos, eliminados, insertados o añadidos es más preferiblemente 2 o 1. En (c) precedentemente mencionado, la conjugación puede lograrse por unión en tándem. En la conjugación, se puede utilizar un enlazador. Como el enlazador, se pueden mencionar cadenas nucleotídicas (p. ej., 1 a aproximadamente 20 nucleótidos) y cadenas no nucleotídicas (p. ej., enlazador $-(CH_2)_n-$, enlazador $-(CH_2CH_2O)_n-$, enlazador de hexaetilenglicol, enlazador TEG, enlazador que contiene péptido, enlazador que contiene el enlace -S-S-, enlazador que contiene el enlace -CONH-, enlazador que contiene el enlace -OPO₃). La pluralidad mencionada en la pluralidad de conjugados previamente descrita no se limita particularmente, siempre y cuando sea de dos o más, y la pluralidad puede ser, por ejemplo, 2, 3 o 4. Cada uno de los nucleótidos en (a) a (c) anteriores, o bien idénticos o diferentes, es un nucleótido que comprende un grupo hidroxilo en la posición 2' de ribosa o un nucleótido que tiene el grupo hidroxilo sustituido con un grupo opcionalmente seleccionado (p. ej., átomo de hidrógeno, átomo de flúor o grupo O-Me) en la posición 2' de ribosa (p. ej., ribosa de pirimidina nucleótido).

20 En un aspecto particular, los aptámeros de la presente invención son clasificables apenas en tres clases de acuerdo con sus estructuras. Un primer aptámero particular es un aptámero que consiste en la secuencia de nucleótidos que se indica con la SEC ID NÚM:61 o su mutante. Un aptámero que consiste en la secuencia de nucleótidos que se indica con la SEC ID NÚM:61, cuando su estructura secundaria es pronosticada por el programa MFOLD, tiene la estructura secundaria potencial que se muestra en la FIG. 9, configurada con una región monocatenaria, una región de primer tallo, una región de bucle interno, una región de segundo tallo y una región de bucle horquilla. En este aptámero, es aceptable la sustitución, eliminación, inserción y/o adición de varios nucleótidos en la región monocatenaria, la región de primer tallo, la región de bucle interno, la región de segundo tallo y región de bucle horquilla. Por ejemplo, en este aptámero, la inserción de varios nucleótidos en la región monocatenaria, la inserción de varios nucleótidos en la región de primer tallo y la adición de varios nucleótidos a la región monocatenaria del extremo 3' (p. ej., SEC ID NÚM:5) son aceptables. Dicho aptámero se une más fuertemente al fragmento N-terminal que al fragmento C-terminal de MK.

30 Un segundo aptámero es un aptámero que consiste en la secuencia de nucleótidos que se indica con la SEC ID NÚM:20 o su mutante. Un aptámero que consiste en la secuencia de nucleótidos que se indica con la SEC ID NÚM:20, la estructura secundaria pronosticada por el programa MFOLD, tiene la estructura secundaria potencial que se muestra en la FIG. 8, estando configurada con una región monocatenaria, una región de primer tallo, una región de bucle interno, una región de segundo tallo y una región de bucle horquilla. En este aptámero, es aceptable la sustitución, eliminación, inserción y/o adición de varios nucleótidos en la región monocatenaria, en la región de primer tallo, en la región de bucle interno, en la región de segundo tallo y en la región de bucle horquilla. Por ejemplo, en este aptámero, la adición de varios nucleótidos a la región monocatenaria, la región de primer tallo y/o el extremo 3' (p. ej., SEC ID NÚM:4) es aceptable. Dicho aptámero prácticamente no exhibe afinidad hacia el fragmento N-terminal de MK, y se une fuertemente al fragmento C-terminal.

35 Un tercer aptámero puede ser un aptámero que consiste en la secuencia de nucleótidos que se indica con la SEC ID NÚM:1 o su mutante.

40 El aptámero de la presente invención puede ser uno en el que el residuo de azúcar (p. ej., ribosa) de cada nucleótido ha sido modificado para aumentar la actividad de unión a MK, la estabilidad, la capacidad de administración del fármaco y similares. Como ejemplos del sitio a modificar en el residuo de azúcar puede mencionarse uno que tenga el átomo de oxígeno en la posición 2', la posición 3' y/o la posición 4' del residuo de azúcar reemplazado con otro átomo, y similares. Como ejemplos de la modificación pueden mencionarse fluoración, O-alkilación (p. ej., O-metilación, O-etilación), O-arilación, S-alkilación (p. ej., S-metilación, S-etilación), S-arilación y aminación (p. ej., -NH₂). Dichas alteraciones en el residuo de azúcar pueden realizarse con un método conocido per se (véanse, por ejemplo, Sproat et al., (1991) Nucle. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991) Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973) Biochemistry 12, 5138-5145).

45 El aptámero de la presente invención puede también tener una base de ácido nucleico (p. ej., purina o pirimidina)

alterada (p. ej., sustitución química) para aumentar la actividad de unión a MK y similares. Como ejemplos de dichas alteraciones pueden mencionarse la alteración de pirimidina en la posición 5, la alteración de purina en la posición 6 y/u 8, la alteración con una amina extracíclica, la sustitución con 4-thiouridina y la sustitución con 5-bromo o 5-yodo-uracilo. El grupo fosfato contenido en el aptámero de la presente invención puede alterarse para conferir resistencia a nucleasa e hidrólisis. Por ejemplo, el grupo P(O)O puede sustituirse con P(O)S (tioato), P(S)S (ditioato), P(O)NR₂ (amidato), P(O)R, R(O)OR', CO o CH₂ (formacetal) o 3'-amina (-NH-CH₂-CH₂-) [donde cada unidad de R o R' es independientemente H o un alquilo sustituido o no sustituido (p. ej., metilo, etilo)].

El grupo de unión es, por ejemplo, -O-, -N- o -S-, y los nucleótidos pueden unirse a un nucleótido adjunto mediante estos grupos de unión.

10 Las alteraciones también pueden incluir alteraciones tales como terminación de cadena en el extremo 3' y 5'.

Una alteración también puede efectuarse añadiendo a un extremo polietilenglicol, aminoácido, péptido, dT invertido, ácido nucleico, nucleósidos, Miristoílo, Oleílo litocólico, Docosanoílo, Lauroílo, Estearoílo, Palmitoílo, Oleoílo, Linoleoílo, otros lípidos, esteroides, colesterol, cafeína, vitaminas, pigmentos, sustancias fluorescentes, agente antineoplásico, toxina, enzimas, sustancia radiactiva, biotina y similares. Para dichas alteraciones, véanse por ejemplo las patentes estadounidenses 5.660.985 y 5.756.703.

15 Los aptámeros de la presente invención pueden sintetizarse químicamente mediante las descripciones de la presente memoria y con un método conocido per se en la técnica. Un aptámero se une a la sustancia diana en una amplia diversidad de modos de unión, como enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, enlaces hidrófobos y enlaces de hidrógeno basados en ribosa, y enlaces de hidrógeno y enlaces de apilamiento basados en bases de ácido nucleico. En particular, los enlaces iónicos basados en la carga negativa del grupo fosfato, que están presentes en el mismo número que el número de nucleótidos constituyentes, son fuertes y se unen a lisina y arginina presentes en la superficie de la carga positiva de la proteína. Por este motivo, pueden sustituirse las bases de ácido nucleico no implicadas en la unión directa a la sustancia diana. En particular, dado que la región de estructura de tallo ya ha formado pares de bases y mira hacia el interior de la estructura helicoidal doble, las bases de ácido nucleico probablemente no se unirán directamente a la sustancia diana. Por lo tanto, incluso cuando un par de bases se reemplaza con otro par de bases, la actividad del aptámero a menudo no disminuye. En estructuras en las que no se forman pares de bases, como estructuras de bucle, siempre que la base de ácido nucleico no esté implicada en la unión directa a la sustancia diana, es posible la sustitución de bases. Con respecto a las modificaciones de la posición 2' de ribosa, el grupo funcional en la posición 2' de ribosa interactúa infrecuentemente de manera directa con la sustancia diana, pero en muchos casos, no tiene relevancia y puede sustituirse con otra molécula modificada. En consecuencia, un aptámero, a menos que el grupo funcional implicado en la unión directa a la molécula diana sea sustituido o eliminado, a menudo retiene su actividad. Es también importante que toda la estructura estérica no cambie demasiado.

20 Un aptámero puede prepararse utilizando el método SELEX o una versión mejorada del mismo (por ejemplo, Ellington et al., (1990) Nature, 346, 818-822; Tuerk et al., (1990) Science, 249, 505-510). En el método SELEX, al aumentar el número de tandas o al usar una sustancia competente, se concentra y selecciona un aptámero que exhibe una fuerza de unión más fuerte para la sustancia diana. En consecuencia, ajustando el número de tandas de SELEX y/o cambiando la condición competitiva, pueden obtenerse en algunos casos aptámeros con diferentes fuerzas de unión, aptámeros con diferentes modos de unión y aptámeros con la misma fuerza de unión y el mismo modo de unión pero con diferentes secuencias de base. El método SELEX comprende un proceso de ampliación por PCR; causando una mutación con el uso de iones de manganeso y similares en el proceso, es posible llevar a cabo el método SELEX con diversidad superior.

25 Los aptámeros obtenidos por SELEX son ácidos nucleicos que exhiben alta afinidad hacia la sustancia diana, y esto no significa su unión al sitio activo de la sustancia diana. Por consiguiente, los aptámeros obtenidos por el método SELEX no siempre actúan en función de la sustancia diana. La MK tiene una región rica en lisina en la región de cola de cada uno de sus extremos N y C, a la cual se cree que un ácido nucleico se une no específicamente. Esta porción de cola no se considera importante en la unión de heparina o sulfato de condroitina. No es fácil preparar un aptámero que inhiba eficazmente una actividad de MK en dicho entorno. De hecho, en la presente invención, se examinaron las actividades inhibitorias de migración celular de 23 clases de aptámeros, y solamente 4 clases de aptámeros retuvieron no menos de 50% de actividad.

30 Puede hacerse que los aptámeros por lo tanto seleccionados con actividad tengan un desempeño incluso superior, llevando a cabo el método SELEX optimizado. SELEX optimizado se refiere a un método en el que SELEX se lleva a cabo nuevamente después de preparar un molde en donde un aptámero con una cierta secuencia fija se cambia parcialmente para incluir secuencias aleatorias o un molde al que se le aplican aproximadamente 10 a 30% de secuencias aleatorias.

35 Un aptámero obtenido por SELEX tiene aproximadamente 80 nucleótidos de longitud, y esto es difícil de preparar como producto farmacéutico tal como está. Por ende, es necesario repetir los intentos de ensayo y error para acortar el aptámero hasta una longitud de aproximadamente 50 nucleótidos o menos, que posibilite una sencilla síntesis química. Dependiendo del diseño del cebador para un aptámero obtenido por SELEX, cambia la facilidad de la

operación de minimización subsiguiente. A menos que el cebador sea diseñado exitosamente, el desarrollo subsiguiente será imposible, incluso si se selecciona un aptámero con actividad mediante SELEX.

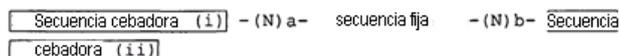
5 Los aptámeros son fácilmente alterables porque permiten la síntesis química. Para aptámeros, al predecir la estructura secundaria usando el programa MFOLD, o al predecir la estructura estérica por análisis de rayos X o análisis de RMN, es posible predecir hasta algún grado qué nucleótido puede ser sustituido o eliminado, y dónde insertar un nuevo nucleótido. Un aptámero con la nueva secuencia pronosticada puede sintetizarse químicamente, y puede determinarse si el aptámero retiene o no la actividad usando un sistema de ensayo existente.

10 Si una región importante para la unión del aptámero obtenido con la sustancia diana se identifica por intentos de ensayo y error como se describió anteriormente, la actividad permanece inalterada en muchos casos, incluso cuando se añade una nueva secuencia a ambos extremos de la secuencia. La longitud de la nueva secuencia no está particularmente limitada.

Las modificaciones, como secuencias, proporcionan una amplia gama de diseño o alteraciones.

15 Como se determinó anteriormente, los aptámeros permiten una amplia gama de diseño o alteraciones. Describimos un método de producción de aptámero que permite una amplia gama de diseño o alteración de un aptámero que comprende una secuencia especificada (p. ej., una secuencia correspondiente a una porción seleccionada entre regiones de tallo, regiones de bucle interno, regiones de bucle horquilla y regiones monocatenarias: en lo sucesivo, abreviadas como secuencia fija según sea necesario).

20 Por ejemplo, el método de producción de dicho aptámero incluye la producción de un aptámero que comprende una secuencia fija, usando una sola clase de molécula de ácido nucleico o una pluralidad de clases de moléculas de ácido nucleico (p. ej., una biblioteca de moléculas de ácido nucleico con diferentes números para "a" o "b") que consiste en una secuencia de nucleótidos indicada con la fórmula:



25 [en la que (N)a representa una cadena de nucleótidos que consiste en unidades "a" de N; (N)b representa una cadena de nucleótidos que consiste en unidades "b" de N; cada una de las unidades de N, o bien idénticas o distintas, es un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en A, G, C, U y T (preferiblemente A, G, C y U). Cada una de "a" y "b", o bien idénticas o distintas, puede ser un número opcionalmente seleccionado, y puede ser, por ejemplo, 1 a aproximadamente 100, preferiblemente 1 a aproximadamente 50, más preferiblemente 1 a aproximadamente 30, incluso más preferiblemente 1 a aproximadamente 20 o 1 a aproximadamente 10], y los pares de cebadores correspondientes a las secuencias cebadoras (i) y (ii), respectivamente.

30 La presente invención también proporciona un complejo que comprende el aptámero de la presente invención y una sustancia funcional unida a éste. El enlace entre el aptámero y la sustancia funcional en el complejo de la presente invención puede ser un enlace covalente o un enlace no covalente. El complejo de la presente invención puede ser uno en el que el aptámero de la presente invención y una o más sustancias funcionales (p. ej., 2 o 3) de la misma clase o de distintas clases estén unidas. La sustancia funcional no está particularmente limitada, siempre y cuando confiera una nueva y determinada función a un aptámero de la presente invención, o sea capaz de cambiar (p. ej., mejorar) una determinada característica que puede poseer un aptámero de la presente invención. Como ejemplos de la sustancia funcional pueden mencionarse proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, azúcares, monosacáridos, polinucleótidos y nucleótidos. Como ejemplos de la sustancia funcional, pueden mencionarse sustancias de afinidad (p. ej., biotina, estreptavidina, polinucleótidos que poseen afinidad hacia una secuencia diana complementaria, anticuerpos, glutatión, sefarsa, histidina), sustancias para etiquetado (p. ej., sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, radioisótopos), enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina), vehículos de administración de fármacos (p. ej., liposoma, microesferas, péptidos, polietilenglicoles), fármacos (p. ej., aquellos utilizados en la terapia de misiles tales como caliqueamicina y docarmicina; análogos de mostaza de nitrógeno tales como ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida o trofosfamida; etileniminas tales como tiotepa; nitrosoureas tales como carmustina; agentes alquilantes tales como temozolomida o dacarbazina; antagonistas metabólicos de tipo folato tales como metotrexato o raltitrexed; análogos de purina tales como tioguanina, cladribina o fludarabina; análogos de pirimidina tales como fluorouracil, tegafur o gemcitabina; vinca alcaloides tales como vinblastina, vincristina o vinorelbina y sus análogos; derivados de podofilotoxina tales como etopósido, taxanos, docetaxel o paclitaxel; antraciclina tales como doxorubicina, epirubicina, idarubicina y mitoxantrona y sus análogos; otros antibióticos citotóxicos tales como bleomicina y mitomicina; compuestos de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; pentostatina, miltefosina, estramustina, topotecan, irinotecán y bicalutamida), y toxinas (p. ej., toxina ricina, liatoxina y Vero toxina). Estas moléculas funcionales finalmente se extraen en algunos casos. Asimismo, las moléculas pueden ser péptidos que pueden ser reconocidos y escindidos por enzimas tales como trombina, metalproteasa de matriz (MMP) y Factor X, polinucleótidos que pueden ser escindidos por nucleasas o endonucleasa de restricción.

El aptámero o el complejo de la presente invención puede usarse, por ejemplo, como producto farmacéutico o como reactivo (p. ej., reactivos diagnósticos, reactivos de prueba (incluidos reactivos experimentales)). Por ejemplo, los

aptámeros o el complejo de la presente invención pueden usarse como inhibidores de migración celular, promotores de proliferación de células T reguladoras, promotores de la función supresora de células T reguladoras, supresores de inhibición de apoptosis, inhibidores de proliferación celular, inhibidores de diferenciación celular, agentes de administración de fármacos, sondas para imágenes *in vivo* para medir las concentraciones sanguíneas de MK, sondas para tinción de tejido, sondas para ELISA y ligandos para separación y purificación de MK.

Los aptámeros o el complejo de la presente invención pueden también utilizarse en la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades tales como enfermedades autoinmunitarias (p. ej., esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad de Sjögren, polimiositis (PM), dermatomiositis (DM), artritis reumática (artritis reumatoidea (RA), artrosis (OA)), enteritis inflamatoria (enfermedad de Crohn y similares), esclerosis sistémica progresiva (PSS), periarteritis nodosa (PN), enfermedades de la tiroides (enfermedad de Basedow y similares), síndrome de Guillain-Barré, cirrosis biliar primaria (PBC), púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmunitaria, miastenia grave (MG), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), diabetes de tipo I, psoriasis, asma, anomalidades funcionales de neutrófilos), cáncer (p. ej., cáncer de esófago, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga urinaria, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de tórax, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de mama, neuroblastoma, glioblastoma, cáncer uterino, cáncer ovárico, tumor de Wilms, cáncer de próstata), adhesión posoperatoria, endometriosis, rechazo en trasplantes, alergias, restenosis que le sigue a cirugía de reconstrucción vascular, enfermedad obstructiva vascular y de las arterias coronarias cardíacas, enfermedad obstructiva vascular cerebral, enfermedad obstructiva vascular renal, enfermedad obstructiva vascular periférica, arteriosclerosis e infarto cerebral. En particular, los aptámeros de la presente invención inhiben la actividad de migración celular de MK, y por lo tanto son útiles para prevenir o tratar esclerosis múltiple, adhesión posoperatoria, endometriosis, artritis reumatoidea y estenosis vascular.

El producto farmacéutico de la presente invención pueden ser uno formulado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable pueden mencionarse, sin limitarse a ello, excipientes tales como sacarosa, almidón, manitol, sorbitol, lactosa, glucosa, celulosa, talco, fosfato de calcio y carbonato de calcio; aglutinantes tales como celulosa, metilcelulosa, hidroxilpropilcelulosa, polipropilpirrolidona, gelatina, goma arábiga, polietilenglicol, sacarosa y almidón; destintegranes tales como almidón, carboximetilcelulosa, hidroxilpropilalmidón, sodio-glicol-almidón, hidrógeno carbonato sódico, fosfato de calcio y citrato de calcio; lubricantes tales como estearato de magnesio, Aerosil, talco y laurilsulfato de sodio; agentes sapórficos tales como ácido cítrico, mentol, sal de amonio-glicirricina, glicina y polvo de naranja; conservantes tales como benzoato de sodio, hidrógeno sódico sulfito, metilparabeno y propilparabeno; estabilizantes tales como ácido cítrico, citrato de sodio y ácido acético; agentes de suspensión tales como metilcelulosa, polivinilpirrolidona y estearato de aluminio; agentes dispersantes tales como tensioactivos; diluyentes tales como agua, disolución salina fisiológica y jugo de naranja; ceras base tales como manteca de cacao, polietilenglicol y querosén; y similares.

Las preparaciones adecuadas para administración oral son preparaciones líquidas preparadas disolviendo una cantidad eficaz de ligando en un diluyente tal como agua, disolución salina fisiológica o jugo de naranja; cápsulas, sachets o comprimidos que comprenden una cantidad eficaz de ligando en forma sólida o granular; una suspensión preparada suspendiendo una cantidad eficaz de ingrediente activo en un dispersante apropiado; una emulsión preparada dispersando y emulsionando una disolución de una cantidad eficaz de ingrediente activo en un dispersante apropiado, y similares.

El producto farmacéutico de la presente invención puede recubrirse con un método conocido per se para los fines de enmascaramiento del sabor, disolución entérica, liberación sostenida y similares, según sea necesario. Como ejemplos de agentes de recubrimiento utilizados para recubrir se emplean hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polioxietilenglicol, Tween 80, Pluronic F68, ftalato acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroximetilcelulosa, Eudragit (fabricado por Rohm, Alemania, copolímero de ácido metacrílico/ácido acrílico), pigmentos (p. ej., óxido de hierro rojo, dióxido de titanio y similares) y similares. El producto farmacéutico puede ser una preparación de liberación rápida o una preparación de liberación sostenida. Como ejemplos de materiales base de liberación sostenida pueden mencionarse liposomas, aterocolágeno, gelatina, hidroxiapatita, PLGA y similares.

Como preparaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intramuscular, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intranasal, administración pulmonar y similares), están disponibles líquidos inyectables estériles isotónicos acuosos y no acuosos, que pueden comprender un antioxidante, una disolución tampón, un agente bacteriostático, un agente isotonzante y similares. Pueden también mencionarse suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden comprender un agente de suspensión, un solubilizante, un espesante, un estabilizante, un antiséptico y similares. La preparación puede incluirse en un recipiente tal como una ampolla o un vial en un volumen de dosis unitaria o en varias dosis divididas. Un ingrediente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable también pueden liofilizarse y conservarse en un estado que puede disolverse o suspenderse en un vehículo estéril apropiado justo antes del uso. Asimismo, además de líquidos inyectables, también son posibles los inhalantes y ungüentos. En el caso de un inhalante, se microniza un ingrediente activo en estado liofilizado y se administra por inhalación usando un dispositivo de inhalación apropiado. Un inhalante puede formularse como apropiado con un tensioactivo convencionalmente utilizado, aceite, aderezo, ciclodextrina o su derivado y similares, según sea necesario.

Aquí, como ejemplos del tensioactivo pueden mencionarse ácido oleico, lecitina, dietilenglicol dioleato, tetrahidroflurfuril oleato, etil oleato, isopropil miristato, gliceril trioleato, gliceril monolaurato, gliceril monooleato, gliceril monostearato, gliceril monolisinoato, alcohol cetílico, alcohol estearílico, polietilenglicol 400, cloruro de cetilpiridinio, sorbitan trioleato (marca Span 85), sorbitan monooleato (marca Span 80), sorbitan monolaurato (marca Span 20), aceite de ricino hidrogenado y polioxietileno (marca HCO-60), polioxietileno (20) sorbitan monolaurato (marca Tween 20), polioxietileno (20) sorbitan monooleato (marca Tween 80), lecitina de origen natural (marca EPICLON), oleilpolioxietileno (2) éter (marca Brij 92), estearil polioxietileno (2) éter (marca Brij 72), lauril polioxietileno (4) éter (marca Brij 30), oleilpolioxietileno (2) éter (marca Genapol 0-020), copolímero en bloque de oxietileno y oxipropileno (marca Synperonic) y similares. Como ejemplos del aceite pueden mencionarse aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de algodón, aceite de girasol y similares. En el caso de un ungüento, una base farmacéuticamente aceptable apropiada (vaselina amarilla, vaselina blanca, parafina, plastibase, silicona, ungüento blanco, cera de abeja, grasa, aceites vegetales, ungüento hidrófilo, vaselina hidrófila, lanolina purificada, lanolina hidrolizada, ungüento absorbente de agua, plastibase hidrófila, ungüento de macrogol y similares) se mezcla con un ingrediente activo y se usa como una preparación.

Un inhalante puede producirse de acuerdo con un método convencional. Específicamente, un inhalante puede producirse convirtiendo a polvo o licuando el aptámero o complejo anteriormente descrito de la presente invención, mezclándolo en un propulsor de inhalación y/o vehículo y vertiéndolo en un recipiente de inhalación apropiado. Cuando el aptámero o complejo anteriormente descrito de la presente invención es un polvo, se puede utilizar un inhalador de polvo mecánico convencional; en el caso de un líquido, se puede utilizar un inhalador tal como un nebulizador. Aquí, como el propulsor, se puede usar uno convencionalmente conocido; pueden mencionarse compuestos de la serie clorofluorocarbono tales como clorofluorocarbono-11, clorofluorocarbono-12, clorofluorocarbono-21, clorofluorocarbono-22, clorofluorocarbono-113, clorofluorocarbono-114, clorofluorocarbono-123, clorofluorocarbono-142c, clorofluorocarbono-134a, clorofluorocarbono-227, clorofluorocarbono-C318 y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, hidrocarburos tales como propano, isobutano y n-butano, éteres tales como éter dietílico, gases comprimidos tales como dióxido de carbono gaseoso y nitrógeno gaseoso, y similares.

La dosis del producto farmacéutico de la presente invención varía dependiendo de la clase y actividad del ingrediente activo, la gravedad de la enfermedad, la especie animal que es sujeto de administración, la tolerabilidad al fármaco del sujeto de administración, el peso corporal, la edad y similares, y la dosis usual, basada en la cantidad de ingrediente activo por día para un adulto, puede ser de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1 mg/kg.

Un vehículo de fase sólida puede tener el aptámero y/o el complejo de la presente invención inmovilizado allí. Como ejemplos del vehículo de fase sólida pueden mencionarse un sustrato, una resina, una placa (p. ej., una placa de múltiples pocillos), un filtro, un cartucho, una columna y un material poroso. El sustrato puede ser uno utilizado en chips de DNA, chips de proteína y similares; por ejemplo, sustratos níquel-PTFE (politetrafluoroetileno), sustratos de vidrio, sustratos de apatita, sustratos de silicio, sustratos de alúmina y similares, y sustratos preparados recubriendo estos sustratos con un polímero y similares. Como ejemplos de la resina, pueden mencionarse partículas de agarosa, partículas de sílice, un copolímero de acrilamida y N,N'-metilenobisacrilamida, partículas de divinilbenceno entrecruzadas con poliestireno, partículas de dextrano entrecruzadas con epiclorohidrina, fibra de celulosa, polímeros entrecruzados de arildextrano y N,N'-metilenobisacrilamida, polímeros sintéticos monodispersados, polímeros hidrófilos monodispersados, Sepharose, Toyopearl y similares, y también se incluyeron resinas preparadas uniendo diversos grupos funcionales a estas resinas. El vehículo de fase sólida puede ser útil, por ejemplo, para purificar, detectar y cuantificar MK.

El aptámero y/o el complejo de la presente invención pueden inmovilizarse en un vehículo de fase sólida con un método conocido per se. Por ejemplo, puede mencionarse un método que introduce una sustancia de afinidad (p. ej., aquellas anteriormente descritas) o un grupo funcional predeterminado al aptámero y/o el complejo de la presente invención, y luego inmoviliza el aptámero o complejo en un vehículo de fase sólida mediante la sustancia de afinidad o un grupo funcional predeterminado. El grupo funcional predeterminado puede ser un grupo funcional que puede someterse a una reacción de acoplamiento; por ejemplo, pueden mencionarse un grupo amino, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo. La presente invención también proporciona un aptámero que tiene dicho grupo funcional introducido allí.

También describimos un método para purificar y concentrar MK. El método de purificación y concentración puede comprender adsorber MK al vehículo de fase sólida descrito en la presente memoria, y eluir la MK adsorbida con un eluyente. La adsorción de MK al vehículo de fase sólida puede lograrse con un método conocido por sí mismo. Por ejemplo, una muestra que contiene MK (p. ej., cultivo bacteriano o celular, o sobrenadante de cultivo, sangre) se introduce en el vehículo de fase sólida o en una composición que contiene el mismo. La elución de MK puede lograrse usando un eluyente tal como una disolución neutra. El eluyente neutro no está particularmente limitado, y puede tener un pH de, por ejemplo, aproximadamente 6 a aproximadamente 9, preferiblemente aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5 y lo más preferiblemente aproximadamente 7 a aproximadamente 8. La disolución neutra puede también ser una que comprenda, por ejemplo, una sal de potasio (p. ej., NaCl, KCl), una sal de magnesio (p. ej., MgCl₂), un tensioactivo (p. ej., Tween 20, Triton, NP40) o glicerina. El método de purificación y concentración puede además comprender lavar el vehículo de fase sólida usando una disolución de lavado después

de la adsorción de MK. Como ejemplos de la disolución de lavado pueden mencionarse aquellas que contienen urea, un agente quelante (p. ej., EDTA), Tris, un ácido o un álcali, y similares. El método de purificación y concentración puede incluso comprender calentar el vehículo de fase sólida. Esta etapa permite la regeneración y esterilización del vehículo de fase sólida.

- 5 La presente invención también proporciona un método para detectar y cuantificar MK. El método de detección y cuantificación de la presente invención puede comprender medir MK, utilizando el aptámero de la presente invención (p. ej., mediante el uso del complejo y el vehículo de fase sólida descritos en la presente memoria). El método para detectar y cuantificar MK puede llevarse a cabo en el mismo modo que un método inmunológico, excepto que se emplea el aptámero de la presente invención en lugar de un anticuerpo. Por ende, usando el aptámero de la presente invención en lugar de un anticuerpo, en el mismo modo que dichos métodos como enzimoanálisis (EIA) (p. ej., ELISA competitivo directo, ELISA competitivo indirecto, ELISA sándwich), radioinmunoanálisis (RIA), inmunoanálisis fluorescente (FIA), técnica de inmunotransferencia (p. ej., uso como sustituto de anticuerpo secundario en la técnica de inmunotransferencia), método de tinción inmunohistoquímica y método de clasificación celular, se puede efectuar la detección y cuantificación. Estos métodos pueden ser útiles, por ejemplo, para medir contenidos de MK en un organismo vivo o en una muestra biológica, y para diagnosticar enfermedades relacionadas con MK.

La presente invención se describe en lo sucesivo en más detalle mediante los siguientes Ejemplos, que no limitan el alcance de la invención en modo alguno.

Ejemplo 1

- 20 Preparación de ácidos nucleicos que se unen específicamente a midkina 1

Se prepararon ácidos nucleicos que se unen específicamente a midkina usando el método SELEX. SELEX se llevó a cabo con mejoras del método de Ellington et al. (Ellington y Szostak, Nature 346, 818-822, 1990) y el método de Tuerk et al. (Tuerk y Gold, Science 249, 505-510, 1990). Como la sustancia diana, se preparó midkina humana usando levadura con referencia al método de Murasugi et al. (Murasugi y Tohma-Aiba, Protein Expression and Purification 27, 244-252, 2003). En lo sucesivo, a menos que se especifique otra cosa, midkina significa midkina humana. La midkina se inmovilizó en una resina de agarosa (Sepharose activada con NHS, fabricada por Amersham Bioscience) por aminoacoplamiento. El aminoacoplamiento se llevó a cabo como se indica en las especificaciones de Amersham Bioscience. La cantidad inmovilizada se confirmó examinando la disolución de midkina justo antes de la inmovilización y el sobrenadante justo después de la inmovilización por SDS-PAGE. Como resultado de SDS-PAGE, no se detectó banda de midkina en el sobrenadante; se confirmó que prácticamente toda la midkina utilizada se había acoplado. Esto significa que se inmovilizaron aproximadamente 175 µg a aproximadamente 70 µl de la resina.

El RNA utilizado en la primera tanda (40N-RNA) se obtuvo transcribiendo un DNA sintetizado químicamente usando el kit de transcripción DuraScribe™ T7 (fabricado por Epicentre). El RNA obtenido por este método tiene la posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina fluoro sustituida. El DNA de 94 nucleótidos de longitud que se muestra a continuación, que tiene una secuencia cebadora en cada extremo de una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos, se usó como molde de DNA. El molde de DNA y los cebadores se prepararon por síntesis química (fabricada por Operon).

molde de DNA: 5'-tcctcattcctgctccta-40N-ttctcttctcctctccc-3' (SEC ID NÚM:71)

- 40 Cebador directo: 5'-taatacgactcactatagggagaggagaagaggaa-3' (SEC ID NÚM:72)

Cebador inv: 5'-tcctcattcctgctccta-3' (SEC ID NÚM:73)

N representa una cualquiera de A, G, C y T. El cebador Directo comprende una secuencia promotora de T7 RNA polimerasa. La variación del grupo de RNA utilizado en la primera tanda fue teóricamente 10¹⁴.

45 El grupo de RNA se añadió a la resina inmovilizada con midkina y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de 30 minutos, para eliminar el RNA no unido a midkina, la resina se lavó con disolución A. Aquí, la disolución A fue una disolución mixta de cloruro de sodio 145 mM, cloruro de potasio 5,4 mM, cloruro de calcio 1,8 mM, cloruro de magnesio 0,8 mM y Tris 20 mM (pH 7,6). El RNA unido a midkina se recuperó calentando a 95°C durante 10 minutos con la adición de un eluyente. Como el eluyente, se usó una disolución mixta de urea 7 M, EDTA 3 mM y TRIS 100 mM, ajustada hasta pH 6,6. El RNA recuperado se amplió por RT-PCR y se transcribió usando el kit de transcripción DuraScribe™ T7, y esto se usó como la mezcla para la tanda siguiente. Con este procedimiento tomado como una tanda, se realizó la misma operación en 7 tandas. Después de completar el método SELEX, el producto PCR se clonó en un vector pGEM-T Easy (fabricado por Promega), y la cepa de Escherichia coli DH5α (fabricada por Toyobo) se transformó con esto. Después de extraer el plásmido de una sola colonia, se determinaron las secuencias de base de 48 clones usando un secuenciador de DNA (ABI PRISM 3100, fabricado por ABI).

Después de efectuar SELEX en 7 tandas, se examinaron las secuencias; las secuencias exhibieron convergencia.

5 Hubo veinte copias de la secuencia que se indica con la SEC ID NÚM:1 y una copia de la forma sustituida en la base 2. Hubo dos copias de la secuencia que se indica con la SEC ID NÚM:2. Hubo una copia de cada una de las secuencias que se muestran en las SEC ID NÚM:3 a 5. Las estructuras secundarias de los RNA que se indican con las SEC ID NÚM:1 a 5 se estimaron usando el programa MFOLD (M. Zuker, Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-3415, 2003). Como resultado, se observaron estructuras bucle interno-tallo-bucle horquilla morfológicamente similares a los RNA que se indican con las SEC ID NÚM:2, 3 y 4 (FIG. 1 a 5). Todos los bucles horquilla estuvieron conformados por ocho nucleótidos; 2 y 3 fueron formas sustituidas en la base 1 en comparación con la SEC ID NÚM:4. Con respecto a los tallos, la SEC ID NÚM:2 se configuró con dos pares de bases, y las SEC ID NÚM:3 y 4 se configuraron con tres pares de bases.

10 Cada secuencia nucleotídica se indica en lo siguiente. Los paréntesis en cada nucleótido muestran modificaciones en la posición 2' y F es un átomo de flúor (en lo sucesivo el mismo).

SEQ ID NO:1:

**gggagaggagaagaggaaau (F) agu (F) u (F) aagggg (F) gaau (F) u (F) u (F) gc (F) g
aaagc (F) u (F) au (F) u (F) u (F) u (F) agu (F) c (F) gc (F) agu (F) agaggac (F) agg
aau (F) gagga**

SEQ ID NO:2:

**gggagaggagaagaggagac (F) u (F) aagu (F) aagagaac (F) ac (F) c (F) ggaau (F)
) gaagggac (F) u (F) u (F) ac (F) gu (F) gu (F) agaggac (F) aggaau (F) gagga**

SEQ ID NO:3:

**gggagaggagaagaggaaagc (F) c (F) u (F) u (F) c (F) u (F) ac (F) c (F) gaaagu (F) g
ggaaagc (F) ac (F) ac (F) au (F) aaau (F) c (F) u (F) ggu (F) agaggac (F) aggaau (F)
F) gaga**

SEQ ID NO:4:

15 **gggagaggagaagaggaaac (F) gu (F) gc (F) u (F) c (F) u (F) gu (F) ac (F) gaggagu (F)
) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggu (F) gu (F) gu (F) agaggac (F) aggaau (F) gag
a**

SEQ ID NO:5:

**gggagaggagaagaggaaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c
(F) ggggu (F) gc (F) au (F) ac (F) agu (F) au (F) aagau (F) agaggac (F) aggaau (F)
gaga**

Secuencia de bucle horquilla

SEC ID NÚM:2 -ggaugaa-

SEC ID NÚM:3 -ggaagca-

20 SEC ID NÚM:4 -ggaagaa-

Ejemplo 2

Preparación de ácidos nucleicos que se unen específicamente a midkina 2

25 Para preparar aptámeros que se unen a midkina pero no se unen a pleiotrofina, una proteína de la familia de midkina, se realizó SELEX incluyendo pre-sustracción usando pleiotrofina. Primero, como con midkina, se inmovilizó la pleiotrofina a resina de agarosa por aminoacoplamiento. Luego, la mezcla de RNA se añadió a la resina unida a pleiotrofina y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, solamente se recuperó el sobrenadante. Teóricamente, este sobrenadante no debería contener un RNA que se una a pleiotrofina. Este sobrenadante se añadió a la resina unida a midkina y se efectuó SELEX del mismo modo que en el Ejemplo 1. La pleiotrofina utilizada había sido expresada en levadura por el método de Murasugi et al. (Murasugi, Kido, Kumai, y Asami, Biosci. Biotech. Biochem. 67 (10), 2288-2290, 2003). El molde de DNA y los cebadores utilizados fueron los
30 mismos que aquellos utilizados en el Ejemplo 1.

Después de completar las 7 tandas, se controlaron las secuencias de 48 clones; se observó convergencia en las secuencias. Entre ellas, hubo diez copias de la misma secuencia que en la SEC ID NÚM:3 obtenida en el Ejemplo 1, y hubo una copia de la forma sustituida en la base 1. Hubo seis copias de la misma secuencia que la SEC ID NÚM:2, y hubo dos copias de la forma sustituida en la base 1. Asimismo, hubo una copia de la misma secuencia que la SEC ID NÚM:5.

Ejemplo 3

Preparación de ácidos nucleicos que se unen específicamente a midkina 3

Quando se inmoviliza midkina por aminoacoplamiento, pueden colapsar porciones importantes, dependiendo del sitio de aminoacoplamiento. Por ende, se realizó unión con filtro SELEX usando una membrana de nitrocelulosa, que no implica la inmovilización a un vehículo. Esto tuvo la finalidad de separar ácidos nucleicos que se unen a la proteína diana y ácidos nucleicos que no se unen, en base al hecho de que las proteínas tienden a unirse a las membranas de nitrocelulosa, mientras que los ácidos nucleicos no tienden a hacerlo. Se combinó una mezcla de RNA y midkina, se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego la mezcla se filtró usando una membrana de nitrocelulosa. Después de lavar completamente la membrana de nitrocelulosa con disolución A, la membrana de nitrocelulosa se sumergió en eluyente B y se calentó a 90°C durante 5 minutos. Posteriormente, en el mismo modo que en el Ejemplo 1, el RNA se recuperó por precipitación de etanol, se amplió por RT-PCR y se transcribió a la mezcla de RNA para la tanda siguiente. El molde de DNA y los cebadores utilizados fueron los mismos que aquellos utilizados en el Ejemplo 1. El eluyente B es un líquido mixto de 50% fenol y urea 6 M.

Tras completar las seis tandas, se controlaron las secuencias de 48 clones; no se obtuvo suficiente convergencia. En consecuencia, se realizó SELEX en tres tandas más; después de completar las nueve tandas, se controlaron las secuencias de los 48 clones; se observó suficiente convergencia. Entre las secuencias, hubo 21 copias de la misma secuencia que en la SEC ID NÚM:2, y cuatro copias de la forma sustituida en la base 1. Hubo diez copias de la misma secuencia que en la SEC ID NÚM:4. Se descubrieron tres nuevas secuencias, ninguna de las cuales exhibió convergencia.

Ejemplo 4

Evaluación de actividades de unión por el método de resonancia de plasmones superficiales

Las actividades de unión de los RNA que se indican con las SEC ID NÚM:1 a 5 para midkina se examinaron por el método de resonancia de plasmones superficiales. Las mediciones se llevaron a cabo usando BIAcore2000, fabricado por BIAcore. El chip del sensor utilizado fue el chip SA, que contenía estreptavidina inmovilizada. Unido a esto había aproximadamente 1000 RU de Poly dT de 16 nucleótidos con biotina unida a su extremo 5'. El RNA que era el ligando tenía Poly A de 16 nucleótidos añadido en su extremo 3', y estaba inmovilizado al chip SA mediante un enlace entre dT y A. La cantidad inmovilizada fue aproximadamente 1000 RU. Se inyectaron 70 µl de midkina para analito, preparada a 0,5 µM. El tampón utilizado para BIAcore fue la disolución A. Como resultado de las mediciones, se halló que todo los RNA indicados por las SEC ID NÚM:1 a 5 se unieron a midkina (FIG. 6). Para control negativo, se realizó una medición similar con el RNA de 40N, que comprendía una secuencia aleatoria de 40 nucleótidos, inmovilizada. Como consecuencia, se descubrió que el RNA de 40N también poseía afinidad hacia midkina. El grado fue alto, con niveles similares a las afinidades de los RNA que se indican con las SEC ID NÚM:1 a 5. Ya que la midkina contiene grandes cantidades de aminoácidos básicos tales como lisina, se espera que se una no específicamente a ácidos nucleicos negativamente cargados.

Por lo tanto, se realizó una medición usando el tampón para BIAcore, un tampón con alta concentración de sal (disolución B) preparado cambiando la concentración de cloruro de sodio de la disolución A a 500 mM. Se anticipó que usando el tampón con alta concentración de sal podría reducirse la adsorción específica de enlace iónico. Como resultado de la medición, se halló que el RNA de 40N apenas se unió a midkina. Mientras tanto, los RNA que se indican con las SEC ID NÚM:2 a 5 se unieron a midkina en grados superiores que con el RNA de 40N (FIG. 7). El hecho de que se produzca la unión con una alta concentración de sal significa que el enlace probablemente sea un enlace hidrófobo. Esto sugiere que estos RNA no pueden unirse no específicamente a la porción de lisina, pero reconocen específicamente la midkina.

Luego se realizó un experimento en el que la midkina se inmovilizó al chip sensor CM4 por aminoacoplamiento, y se inyectó el RNA que se indica con las SEC ID NÚM:4 o 5, como analito, mientras se controlaba la afinidad de RNA y midkina. La inmovilización de midkina se logró usando N-hidroxisuccinimida (NHS, 11 mg/l) e hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 75 mg/l) conforme a las especificaciones de BIAcore. Se diluyó la midkina con tampón HBS-EP (fabricado por BIAcore) y se usó a una concentración de 20 µg/ml. Para bloqueo, se usó hidrocloreuro de etanolamina 1 M (pH 8,5). Se inmovilizó MK (1=59, MK=N, fabricada por Peptide Institute, Inc.) al flujo celular 2 de un chip sensor, se inmovilizó MK (60=121, MK=C, fabricado por Peptide Institute, Inc.) al flujo celular 3, y se inmovilizó midkina de longitud total (MK=NC) al flujo celular 4. El flujo celular 1 se usó como una célula para control. Inmovilizando 3 clases de midkina y fragmento de midkina a un chip sensor como se describió previamente pueden medirse las afinidades hacia 3 clases de ligandos a la vez. Como resultado de la medición, se halló que el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4 se unió a la midkina de longitud total (en lo sucesivo MK-NC) y

al dominio C de midkina (en lo sucesivo MK-C), pero no se unió al dominio N de midkina (en lo sucesivo MK-N) (Tabla 1). Mientras tanto, el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5 se unió a MK-NC, MK-N y MK-C, pero la afinidad fue superior para MK-N que para MK-C.

Tabla1

Afinidad de midkina y diversos analitos			
	Midkina		
	Longitud total	MK-N	MK-C
SEC ID NÚM:4	+++	-	++
SEC ID NÚM:5	+++	++	+
Heparina	+++	+	+++
Sulfato de condroitina E	+++	+	+++
Sulfato de condroitina C	+	-	+
tRNA	+++	-	+++

5 Se midió con el método de resonancia de plasmones superficiales. Se inmovilizó midkina al chip sensor CM4 y se inyectaron varios analitos. La afinidad es superior en el orden de +++, ++, + y -.

Se realizaron experimentos similares usando como analito, en lugar de RNA, heparina (Heparina, Sal de Sodio, Mucosa Porcina Intestinal, Bajo Peso Molecular, Pm: 5000, fabricada por Calbiochem), sulfato de condroitina E (de cartílago de calamar, fabricado por Seikagaku Corporation), sulfato de condroitina C (de cartílago de tiburón, Pm: 40.000-80.000, fabricado por Seikagaku Corporation), o tRNA (fabricado por Sigma). Como resultado, se descubrió que todos estos analitos tuvieron baja afinidad hacia MK-N y se unieron principalmente a MK-C (Tabla 1).

10 A partir de lo anteriormente expresado, se descubrió que el RNA indicado con la ID NÚM:4, como heparina y similares, se unió al dominio C de midkina. Mientras tanto, se descubrió que el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5 tuvo baja afinidad hacia el dominio C y se unió más fuertemente al dominio N. Esto demuestra que los RNA que se indican con las SEC ID NÚM:4 y 5 se unen a diferentes sitios de midkina. Se sabe que la midkina tiene en su dominio C un sitio activo que es un sitio de unión a heparina (Muramatsu H et al., Biochem Biophys Res Commun. 1994 Sep 15;203(2):1131-9., 106.; Iwasaki W et al., EMBO J. 1997 Dec 1:16(23):6936-46.).

20 Se determinó si el RNA indicado con la SEC ID NÚM:5 poseía o no una actividad de unión para la proteína de la familia midkina pleiotrofina, mediante el método de resonancia de plasmones superficiales anteriormente descrito. El RNA se inmovilizó al chip sensor SA y se inyectó pleiotrofina 0,5 µM. Para reducir la adsorción no específica, se añadieron 0,4 mg/ml de tRNA a la disolución de pleiotrofina. Como resultado de la medición, se halló que el RNA indicado por la SEC ID NÚM:5 poseía una actividad de unión para pleiotrofina, pero el grado era inferior que aquel para midkina. Usando el RNA de 40N como ligando, se realizó una medición similar. Tanto la midkina como la pleiotrofina se unieron al RNA de 40N, pero el grado fue inferior que aquel para el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5. El RNA de 40N exhibió afinidad superior hacia midkina que hacia pleiotrofina. A partir de lo antedicho, se descubrió que la pleiotrofina, al igual que la midkina, tendió a unirse a los ácidos nucleicos. También se halló que el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5 tuvo mayor afinidad hacia midkina que hacia pleiotrofina.

30 Luego se determinó si los RNA indicados con las SEC ID NÚM:4 y 5 poseían o no afinidad hacia otras proteínas. Como las proteínas, se emplearon IgG1 humana (fabricada por Calbiochem) y albúmina humana (fabricada por Sigma). Cada RNA se inmovilizó usando el chip sensor SA como se describió precedentemente, y se inyectó cada proteína como analito. Como consecuencia, la IgG1 humana y la albúmina humana no se unieron a ninguno de los RNA indicados con las SEC ID NÚM:4 y 5 en absoluto. A partir de lo antedicho, se halló que los RNA que se indican con las SEC ID NÚM:4 y 5 no se unieron a albúmina humana e IgG humana, las cuales están presentes en grandes cantidades en la sangre.

35 Se midieron las actividades de unión de los RNA que se indican en las SEC ID NÚM:2 a 7, 31, 32, 36, 40, 40-1 y 40-2 con MK. Como se describió previamente, la medición se llevó a cabo con MK inmovilizada al chip sensor CM4. Como resultado, se halló que todos estos RNA tuvieron afinidad hacia MK.

Ejemplo 5

Evaluación de aptámeros de RNA mediante el experimento de migración celular

40 Se sabe que la midkina posee acción infiltrante en las células progenitoras de osteoblastos (Qi et al., J. Biol. Chem. 276 (19), 15868-15875, 2001). Por ende, se examinó si los aptámeros de RNA preparados inhibían o no la actividad de migración celular de midkina, usando células UMR106 de una línea celular progenitora de osteoblasto de rata

(ATCC Núm. CRL1661). Se aplicaron 30 μ l de midkina 1,5 μ M a la superficie exterior de la membrana de Chemotaxicell (diámetro del poro de la membrana de 8 μ m, fabricada por Kurabo) para inmovilizar la midkina a la superficie exterior de la membrana. La membrana Chemotaxicell inmovilizada con midkina se dispuso en una placa de cultivo de 24 pocillos que contenía 500 μ l de un medio (enriquecido con albúmina de suero bovino al 0,3%, medio de Eagle Modificado con Dulbecco) enriquecido con cada aptámero de RNA allí añadido a 100 nM. Se dispusieron 200 μ l de células UMR106 en la capa interna de la cámara Chemotaxicell a una densidad de 1×10^6 células/ml, y se cultivaron a 37°C durante 4 horas. Las células remanentes en la capa interna de la cámara de Chemotaxicell se extrajeron, y las células que se habían infiltrado y adherido a la superficie con midkina se fijaron con metanol. La cámara de Chemotaxicell se sumergió en una disolución acuosa al 1% de Cristal Violeta durante 30 minutos para teñir las células. Después de lavar la cámara de Chemotaxicell con agua destilada y de secar, se extrajo el pigmento con una disolución mixta de 200 μ l de SDS al 1% y triton al 1% X100. Se transfirieron 150 μ l del extracto a una microplaca de 96 pocillos, y se determinó su absorbancia a 590 nm.

Como resultado de la medición, se descubrió que los RNA que se indican con las SEC ID NÚM:1, 2, 4 y 5 tuvieron una destacada actividad inhibidora de la migración celular. Los resultados se exponen en la Tabla 2. El aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:5 exhibió la más alta actividad inhibidora, donde la media para 14 mediciones es de 76%. El RNA de 40N, utilizado como control negativo, no exhibió actividad inhibidora.

Tabla 2

Actividades inhibidoras de la migración celular de aptámeros preparados contra midkina y pleiotrofina				
SEC ID NÚM	Midkina		Pleiotrofina	
	% actividad inhibidora	Número de mediciones	% actividad inhibidora	Número de mediciones
1	36	4	0	2
2	45	4	-	-
4	63	6	8	2
5	76	14	17	6
40N-RNA	8	6	28	2
Concentración de RNA: 100 nM				

Aquí, el % de actividad inhibidora es un valor obtenido restando el número de células que se mueven con la adición del aptámero del número de células que se mueven sin la adición del aptámero (absorbancia de extracto celular teñido) tomado como 100. En la tabla, cada valor de % es la media para el número de mediciones indicado.

Luego se midió si los aptámeros indicados con las SEC ID NÚM:4 y 5 poseían o no actividad inhibidora de la migración celular contra pleiotrofina. El experimento se realizó como se describió anteriormente, excepto que se usó pleiotrofina en lugar de midkina. Como resultado del experimento, se halló que estos aptámeros no exhibieron una actividad inhibidora destacada contra pleiotrofina (Tabla 2).

Después se midió si la heparina, sulfato de condroitina E, sulfato de condroitina C inhiben o no las actividades de migración celular de midkina y pleiotrofina. El experimento se realizó como se describió anteriormente, excepto que los aptámeros se reemplazaron con heparina, sulfato de condroitina E o sulfato de condroitina C. El insumo de heparina utilizado fue un producto fabricado por Nacalai Tesque. Los insumos de sulfato de condroitina E y C utilizados fueron los mismos que aquellos utilizados en el Ejemplo 4. Las concentraciones de heparina y sulfato de condroitina E fueron 0,1, 1, 10 y 100 μ g/ml. Como resultado del experimento, la heparina a 0,1 μ g/ml inhibió las actividades de migración celular de midkina y pleiotrofina. A una concentración de 1 μ g/ml, la heparina inhibió las actividades de migración celular de midkina y pleiotrofina por no menos de 80%. Mientras tanto, el sulfato de condroitina E, a una concentración de 10 μ g/ml, inhibió la midkina por 49%, y la pleiotrofina por 69%. Suponiendo que el peso molecular del sulfato de condroitina C fuese de 40.000, el experimento se realizó a 500 nM (20 μ g/ml). Como resultado, cuando la actividad inhibidora del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:4 (500 nM) se tomó como 100, la actividad inhibidora del sulfato de condroitina C fue 44.

A partir de lo antedicho, se descubrió que los aptámeros indicados con las SEC ID NÚM:1, 2, 4 y 5 se unieron específicamente a midkina para inhibir su actividad de migración celular. El RNA de 40N se adsorbió no específicamente a midkina de manera electrostática, pero no inhibió la actividad de migración celular. Esto demuestra que los RNA que se habían obtenido por SELEX no son atribuibles a adsorción no específica, pero se unen a un importante sitio asociado con la actividad de migración celular. La heparina y el sulfato de condroitina E inhibieron de forma equivalente la actividad de migración celular sin distinguir entre midkina y pleiotrofina. Mientras que los aptámeros que se indican con las SEC ID NÚM:4 y 5 inhibieron solamente la actividad de midkina. Ya que la midkina y la pleiotrofina tienen una homología de 50%, y también ya que el sitio de unión a heparina se conserva a

un alto nivel, son entendibles las altas especificidades de los aptámeros.

Ejemplo 6

Miniaturización y estabilización del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:4

5 El aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:4 tiene 77 nucleótidos de longitud, donde la posición 2' de la ribosa de su nucleótido de pirimidina está fluoro-sustituída. Para permitir la síntesis química, para reducir la toxicidad y para mejorar la estabilidad en la sangre, se llevaron a cabo miniaturización y estabilización de este aptámero. Las operaciones de miniaturización y estabilización se realizaron en base a la estructura secundaria estimada por el programa MFOLD, y la actividad se evaluó con un experimento de inhibición de migración celular. En el experimento de inhibición de la migración celular, la concentración de RNA fue 100 nM o 500 nM. Dado que se presentan algunos errores en resultados experimentales dependiendo de la condición celular, una muestra previamente ensayada se incluyó como control positivo en cada medición. Las actividades inhibitoras obtenidas cuando la concentración de RNA fue 500 nM se exponen en la Tabla 3 (Tablas 3-1 y 3-2). Las actividades inhibitoras se expresan como valores relativos con la actividad del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:4 tomada como 100, como para aclarar las diferencias de actividad entre las formas alteradas. El % de actividad inhibitora del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:4 (un valor obtenido restando el número de células que se mueven con la adición del aptámero de 100, que es el número de células que se mueven sin la adición del aptámero) fue 73% cuando la concentración de RNA fue 500 nM. Ésta es la media para 4 mediciones. La media para 6 mediciones del % de actividad inhibitora fue 63% cuando la concentración de RNA fue 100 nM.

Tabla 3-1

Actividades inhibitoras de migración celular de formas alteradas del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4 contra midkina			
SEC ID NÚM	Actividad	Número de mediciones	Longitud (nt)
4	100	2	77
	57 (ratón)	2	
6	110	2	67
7	91	2	64
8	100	2	69
9	57	2	66
10	81	2	73
11	100	2	77
12	100	2	58
13	100	2	50
14	100	2	54
15	75	2	56
16	61	2	57
17	68	2	46
18	88	2	37
19	94	2	44
20	97	2	42
20-1	109	2	42
20-2	84	2	42
20-3	60	2	42
20-4	60	2	42
20-5	88	2	42
20-6	69	2	42

Actividades inhibitoras de migración celular de formas alteradas del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4 contra midkina			
SEC ID NÚM	Actividad	Número de mediciones	Longitud (nt)
20-7	88	2	42
20-8	99	2	42
20-9	130	2	42
20-10	86	2	42
20-11	76	2	42
20-12	53	2	42
20-13	89	2	42

Tabla 3-2

SEC ID NÚM	Actividad	Número de mediciones	Longitud (nt)
21	0	2	44
22	70	6	33
23	66	2	38
24	65	2	38
25	81	2	41
26	18	2	41
27	78	2	41
28	71	2	31
29	74	2	31
Cond-C	44	2	

La concentración de RNA fue 500 nM. Las actividades se expresan como valores relativos con la actividad del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4 tomada como 100. El % de actividad inhibitora del RNA que se muestra con la SEC ID NÚM:4 fue 73%. Este valor es la media para 4 mediciones. (ratón) indica un valor relativo a midkina de ratón. Cond-C indica sulfato de condroitina C.

5

Las partes alteradas en las formas alteradas (SEC ID NÚM:6-29) se explican a continuación.

SEC ID NÚM:6: se eliminaron 10 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 3' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4.

**gggagaggagaagaggaac (F) gu (F) gc (F) u (F) c (F) u (F) gu (F) ac (F) gaggagu (F)
) agc (F) c (F) ggaagaaggc (F) ggu (F) gu (F) gu (F) agaggac (F) a**

10 SEC ID NÚM:7: se eliminaron 14 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4, y se añadió una G para transcripción.

**gggaac (F) gu (F) gc (F) u (F) c (F) u (F) gu (F) ac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) gg
aaagaaggc (F) ggu (F) gu (F) gu (F) agaggac (F) aggaau (F) gagga**

SEC ID NÚM:8: se eliminaron 4 pares de bases del tallo en el lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4.

**gggagaggagaagaggaac (F) gc (F) u (F) gu (F) ac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) gg
aaagaaggc (F) ggu (F) gu (F) gu (F) agc (F) aggaau (F) gagga**

15

SEC ID NÚM:9: se eliminaron 8 nucleótidos del bucle interno y su CGG en el lado opuesto del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4.

**gggagaggagaagaggaac (F) gu (F) gc (F) u (F) c (F) u (F) gu (F) ac (F) gc (F) c (F)
ggaaagaaggu (F) gu (F) gu (F) agaggac (F) aggaau (F) gagga**

SEC ID NÚM:10: la porción de bucle se reemplazó con GAAA tetra bucle en el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4.

**gggagaggagaagaggaac (F) gu (F) gc (F) u (F) c (F) u (F) gu (F) ac (F) gaggagu (F)
) agc (F) c (F) gaaaggc (F) ggu (F) gu (F) gu (F) agaggac (F) aggaau (F) gagga**

- 5 SEC ID NÚM:11: se reemplazaron 3 pares de bases G-U con los pares de bases G-C en el tallo en el lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:4.

**gggagaggagaagaggaac (F) gu (F) gc (F) u (F) c (F) u (F) gc (F) ac (F) gaggagu (F)
) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F) gc (F) agaggac (F) aggaau (F) gag
ga**

- 10 SEC ID NÚM:12: se reemplazaron tres pares de bases G-U con los pares de bases G-C en el tallo del lado del extremo y se eliminaron 11 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 3' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:8.

**gggagaggagaagaggaac (F) gc (F) u (F) gc (F) ac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) gg
aaagaaggc (F) ggc (F) gu (F) gc (F) agc (F)**

SEC ID NÚM:13: se eliminaron 11 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:12, y se añadió allí GGG para transcripción.

**gggagaggaac (F) gc (F) u (F) gc (F) ac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) ggaaagaagg
c (F) ggc (F) gu (F) gc (F) agc (F)**

- 15 SEC ID NÚM:14: se eliminaron un par de bases G-C y un par de bases C-G del tallo en el lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:12.

**gggagaggagaagaggaac (F) gc (F) u (F) ac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) ggaaaga
aggc (F) ggc (F) gu (F) agc (F)**

SEC ID NÚM:15: se eliminaron A36 y A37 de la porción de bucle del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:12.

**gggagaggagaagaggaac (F) gc (F) u (F) gc (F) ac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) gg
aaagggc (F) ggc (F) gu (F) gc (F) agc (F)**

- 20 SEC ID NÚM:16: se eliminó A23 de la porción de bucle interno del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:12.

**gggagaggagaagaggaac (F) gc (F) u (F) gc (F) ac (F) gagggu (F) agc (F) c (F) gga
aagaaggc (F) ggc (F) gu (F) gc (F) agc (F)**

SEC ID NÚM:17: se eliminaron un par de bases G-C y un par de bases C-G del tallo en el lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:13.

**gggagaggaac (F) gc (F) u (F) ac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) g
gc (F) gu (F) agc (F)**

- 25 SEC ID NÚM:18: se eliminaron 11 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:17, y se añadió allí GG para transcripción.

**gggc (F) u (F) ac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F) ag
c (F)**

SEC ID NÚM:19: se eliminó un par de bases C-G de la parte del tallo en el lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:17.

**gggagaggaac (F) gu (F) ac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F)
) gu (F) ac (F)**

SEC ID NÚM:20: se eliminaron un par de bases C-G y un par de bases U-A de la parte del tallo en el lado del extremo que se indica con la SEC ID NÚM:17.

**gggagaggaac (F) gac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F)
 c (F)**

- 5 SEC ID NÚM:20-1: la parte monocatenaria del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20 se modificó completamente con OMe.

**g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) gac (F) gaggagu (F) agc
 (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F) c (F)**

SEC ID NÚM:20-2: el primer tallo en el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20 se modificó con OMe.

**gggagaggaac (F) g (M) a (M) c (F) g (M) aggagu (F) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F)
 ggc (F) g (M) u (F) c (F)**

10

SEC ID NÚM:20-3: el segundo tallo en el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20 se modificó con OMe.

**gggagaggaac (F) gac (F) gaggagu (F) ag (M) c (F) c (F) ggaaagaag (M) g (M) c (F)
 ggc (F) gu (F) c (F)**

SEC ID NÚM:20-4: G en la parte de bucle del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20 se reemplazó con OMe.

**gggagaggaac (F) gac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) g (M) g (M) aaag (M) aaggc (F)
 ggc (F) gu (F) c (F)**

15

SEC ID NÚM:20-5: A en la parte abultada del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20-1 se reemplazó con OMe.

**g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) gac (F) ga (M) gga (M) gu
 (F) a (M) gc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F) c (F)**

SEC ID NÚM:20-6: G en la parte abultada del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20-1 se reemplazó con OMe.

**g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) gac (F) gag (M) g (M) ag (F)
 M) u (F) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F) c (F)**

SEC ID NÚM:20-7: A en la parte de bucle del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20-1 se modificó con OMe.

**g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) gac (F) gaggagu (F) agc
 (F) c (F) gga (M) aa (M) gaaggc (F) ggc (F) gu (F) c (F)**

20

SEC ID NÚM:20-8: A en la parte de bucle del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20-5 se modificó con OMe.

**g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) gac (F) ga (M) gga (M) gu
 (F) a (M) gc (F) c (F) gga (M) aa (M) gaaggc (F) ggc (F) gu (F) c (F)**

SEC ID NÚM:20-9: el primer tallo en el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20-5 se modificó con OMe.

**g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) g (M) a (M) c (F) ga (M) gg
 a (M) gu (F) a (M) gc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F) g (M) u (F) c (F)**

25

SEC ID NÚM:20-10: algunas partes del RNA que se indica en la SEC ID NÚM:20-5 se modificaron con OMe.

**g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) gac (F) ga (M) gga (M) gu
 (F) a (M) gc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) g (M) g (M) c (F) gu (F) c (F)**

SEC ID NÚM:20-11: algunas partes del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20-5 se modificaron con OMe.

**g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) g (M) a (M) c (F) ga (M) gg
a (M) gu (F) a (M) gc (F) c (F) gga (M) aa (M) gaaggc (F) g (M) g (M) c (F) g (M) u (F) c
(F)**

SEC ID NÚM:20-12: algunas partes del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20-5 se modificaron con OMe.

**g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) g (M) a (M) c (F) ga (M) gg
a (M) gu (F) a (M) gc (F) c (F) gga (M) aa (M) g (M) aaggc (F) ggc (F) g (M) u (F) c (F)**

5 SEC ID NÚM:20-13: algunas partes del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20-5 se modificaron con OMe.

**g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) c (F) g (M) a (M) c (F) ga (M) gg
a (M) gu (F) a (M) gc (F) c (F) gga (M) aa (M) gaag (M) gc (F) ggc (F) g (M) u (F) c (F)**

SEC ID NÚM:21: un par de bases G-C se eliminó de la parte de tallo en el lado de bucle del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:17.

**gggagaggaac (F) gc (F) u (F) ac (F) gaggagu (F) agc (F) ggaaagaagc (F) ggc (F)
gu (F) agc (F)**

10 SEC ID NÚM:22: se eliminaron 11 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM: 20, y se añadieron dos G para transcripción. gggac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) gaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F) c (F)

SEC ID NÚM:23: la porción de bucle se reemplazó con GAAA tetra bucle en el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20.

**gggagaggaac (F) gac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) gaaaggc (F) ggc (F) gu (F) c (F)
F)**

15 SEC ID NÚM:24: la porción de bucle se reemplazó con UUCG tetra bucle en el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20.

**gggagaggaac (F) gac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) u (F) u (F) c (F) gggc (F) ggc (F)
F) gu (F) c (F)**

20 SEC ID NÚM:25: la porción de bucle interno en el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20 se reemplazó con el bucle interno del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:2.

**gggagaggaac (F) gac (F) gagaac (F) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F)
) c (F)**

SEC ID NÚM:26: se eliminó G18 del bucle interno en el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20.

**gggagaggaac (F) gac (F) gagagu (F) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F)
) c (F)**

SEC ID NÚM:27: se eliminó A19 del bucle interno del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:20.

**gggagaggaac (F) gac (F) gaggu (F) agc (F) c (F) ggaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F)
) c (F)**

25 SEC ID NÚM:28: se eliminaron dos G del extremo 5' y se cambió el segundo par de bases A-U a G-C en el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:22. ggc (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) gaaagaaggc (F) ggc (F) gc (F) c (F)

SEC ID NÚM:29: se eliminaron dos G del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:22. gac (F) gaggagu (F) agc (F) c (F) gaaagaaggc (F) ggc (F) gu (F) c (F)

30 Se examinó la actividad inhibidora de la migración celular del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:4 contra

midkina de ratón. El método experimental fue el mismo que aquel para el experimento anteriormente descrito en midkina humana. Como resultado del experimento, el % de actividad inhibitora de este aptámero fue 50%. Esto es equivalente a aproximadamente 57 relativo a la actividad inhibitora de este aptámero contra midkina humana tomado como 100; la actividad disminuyó de manera obvia, en comparación con la actividad inhibitora contra midkina humana. Por lo tanto, se descubrió que este aptámero es un aptámero que exhibe una mayor actividad inhibitora contra midkina humana.

Como se muestra en la Tabla 3, el aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:4, que tenía originalmente 77 nucleótidos de longitud, podría miniaturizarse a 31 nucleótidos, sin reducir considerablemente la actividad (SEC ID NÚM:28, 29). La porción de bucle horquilla de este aptámero obtenido no necesita ser siempre GGAAAGAA; el aptámero retuvo la actividad, incluso cuando la porción de bucle horquilla fue GAAA o UUCG tetra-bucle (SEC ID NÚM:23, 24). Incluso cuando la porción de bucle interno se reemplazó con la porción de bucle interno del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:2, se retuvo la actividad (SEC ID NÚM:25). Incluso cuando se eliminó A19, se retuvo la actividad, pero cuando se eliminó G18, la actividad disminuyó de manera extrema (SEC ID NÚM:26, 27). Mientras tanto, se descubrió que cuando se eliminó el par de bases C-G del tallo en el lado del bucle, la estructura secundaria cambió ampliamente y se perdió la actividad inhibitora (SEC ID NÚM:21). A partir de lo antedicho, se halló que el aptámero de 42 nucleótidos que se indica con la SEC ID NÚM:20 (FIG. 8) retuvo la actividad incluso después de reemplazar algunos nucleótidos con otros nucleótidos o de eliminarlos, siempre que su estructura básica no cambiara en gran medida.

Ejemplo 7

Miniaturización y estabilización del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:5

El aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:5 tiene 77 nucleótidos de longitud, en donde la posición 2' de la ribosa del nucleótido de pirimidina está fluoro-sustituida. Para permitir la síntesis química, para reducir la toxicidad y para mejorar la estabilidad en la sangre, se realizaron miniaturización y estabilización de este aptámero. Las operaciones de miniaturización y estabilización se llevaron a cabo en base a la estructura secundaria estimada por el programa MFOLD, y la actividad se evaluó por un experimento de inhibición de migración celular. La concentración de RNA en el experimento de inhibición de migración celular fue 100 nM o 500 nM. Ya que ocurren algunos errores en los resultados experimentales dependiendo de la condición de las células, se incluyó una muestra previamente ensayada como control positivo en cada medición. Las actividades inhibitoras obtenidas cuando la concentración de RNA fue 100 nM se exponen en la Tabla 4-1. Las actividades inhibitoras se expresan como valores relativos con la actividad del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:5 tomada como 100, como para aclarar las diferencias de actividad entre las formas alteradas. El % de actividad inhibitora del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:5 (un valor obtenido restando el número de células que se mueven con la adición del aptámero de 100, que es el número de células que se mueven sin la adición del aptámero) fue 76% cuando la concentración de RNA fue 100 nM. Esto equivale a la media para 14 mediciones. Con la concentración de RNA cambiada a 500 nM, se realizó un experimento similar. Los resultados se exponen en la Tabla 4-2 (Tabla 4-2-1, Tabla 4-2-2). Las actividades se expresan como valores relativos con la actividad del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:40 tomada como 100. El % de actividad inhibitora del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:40 fue 82%. Ésta es la media para 4 mediciones.

Tabla 4-1

SEC ID NÚM	Midkina		Pleiotrofina		longitud (nt)
	actividad	Número de mediciones	actividad	Número de mediciones	
5	100	14	13	6	77
30	44	2	-	-	71
31	94	6	17	4	67
32	100	6	11	4	57
33	40	6	5	4	61
34	0	2	-	-	46
35	90	4	0	2	51
36	91	4	27	2	53
36-1	60	4	0	2	53
37	0	2	-	-	49
38	0	2	-	-	57

ES 2 397 715 T3

SEC ID NÚM	Midkina		Pleiotrofina		longitud (nt)
	actividad	Número de mediciones	actividad	Número de mediciones	
39	52	2	-	-	45
40	98	4	0	2	49
40-1	80	2	-	-	49
40-2	31	2	-	-	49
40-3	65	2	-	-	49
41	97	4	8.1	2	52
42	110	4	8.7	2	52
43	42	2	-	-	52

La concentración de RNA fue 100 nM. Las actividades se expresan como valores relativos con la actividad inhibidora del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5 contra midkina tomada como 100. El % de actividad inhibidora del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5 contra midkina fue 76%. Este valor es la media para 14 mediciones.

Tabla 4-2-1

SEC ID NÚM	Actividad	Número de mediciones	Longitud (nt)
40	100	2	49
40-1	99	2	49
40-2	88	2	49
40-3	100	2	49
44	100	2	47
45	100	2	45
45-1	100	2	45
45-2	100	2	45
45-3	56	2	45
45-4	100	2	45
45-4-1	98*	2	45
45-4-1-1	85*	2	45
46	92	2	49
47	84	2	48
48	60	2	48
49	69	2	48
50	91	2	43
51	100	2	51
52	100	2	51
53	100	2	51
54	100	2	45
55	100	2	43
56	100	2	43
57	100	2	43
58	100	2	43

ES 2 397 715 T3

SEC ID NÚM	Actividad	Número de mediciones	Longitud (nt)
59	53	2	29
60	70	2	35

Tabla 4-2-2

SEC ID NÚM	Actividad	Número de mediciones	Longitud (nt)
61	100	2	39
61-1	45*	2	39
61-2	55*	2	39
61-3	80	2	39
61-4	86	4	39
61-5	40	4	39
61-6	57	2	39
61-7	46	2	39
61-8	54	4	39
61-9	39	2	39
62	44	2	39
63	97	2	45
64	55*	2	37
65	0	2	39
66	51	2	38
67	110	2	38
68	72	2	39
69	60	2	39
70	110	2	39
tRNA	28	2	
Trombina-S	0	2	
VIH-S	48	2	

La concentración de RNA fue 500 nM. Las actividades se expresan como valores relativos con la actividad inhibidora del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:40 contra midkina tomada como 100. El % de actividad inhibidora del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:40 contra midkina fue 82%. Estos valores son la media para 4 mediciones.

5 *: valor tentativamente identificado

Las partes alteradas en las formas alteradas (SEC ID NÚM:30-70) se explican a continuación.

SEC ID NÚM:30: se eliminaron 6 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5, y se añadió una G para transcripción.

**ggagaagaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggg
u (F) gc (F) au (F) ac (F) agu (F) au (F) aagau (F) agaggac (F) aggaau (F) gagga**

10 SEC ID NÚM:31: se eliminaron 10 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 3' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5.

**gggagaggagaagaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c
(F) ggggu (F) gc (F) au (F) ac (F) agu (F) au (F) aagau (F) agaggac (F) a**

SEC ID NÚM:32: se eliminaron 20 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 3' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5.

gggagaggagaagaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) gc (F) au (F) ac (F) agu (F) au (F) aag

5 SEC ID NÚM:33: se eliminaron 6 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' y se eliminaron 10 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 3' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5.

ggagaagaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggg u (F) gc (F) au (F) ac (F) agu (F) au (F) aagau (F) agaggac (F) a

SEC ID NÚM:34: se eliminaron 12 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' y se eliminaron 20 nucleótidos de la parte monocatenaria del lado del extremo 3' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:5.

ggaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) g c (F) au (F) ac (F) agu (F) au (F) aag

10 SEC ID NÚM:35: se eliminaron 6 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 3' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:32.

gggagaggagaagaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) gc (F) au (F) ac (F) ag

SEC ID NÚM:36: se eliminaron dos pares de bases del tallo del lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:32.

15 **gggagaggagaagaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gg gu (F) gc (F) ac (F) agu (F) au (F) aag**

SEC ID NÚM:36-1: la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:36 se modificó completamente con OMe.

g (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) g (M) a (M) a (M) g (M) a (M) g (M) g (M)) a (M) a (M) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) gc (F)) ac (F) agu (F) au (F) aag

20 SEC ID NÚM:37: se eliminaron cuatro pares de bases del tallo en el lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:32.

gggagaggagaagaggaagc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) gc (F) agu (F) au (F) aag

SEC ID NÚM:38: la parte monocatenaria del lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:32 se cambió a Poly U, donde U indica ribosa fluorada en la posición 2'.

gggu (F) u (F) gu (F) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) gc (F) au (F) ac (F) agu (F) au (F) aag

25 SEC ID NÚM:39: se eliminaron 6 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 3' y se eliminó un par de base en el lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:36.

gggagaggagaagaggaagc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F)) gc (F) c (F) ag

SEC ID NÚM:40: se eliminaron 8 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 3' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:36.

**gggagaggagaagaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c
(F) ggu (F) gc (F) au (F) ac (F)**

SEC ID NÚM:40-1: se añadió polietilenglicol con peso molecular de 2000 al extremo 5' mediante el enlazador C12 y se añadió idT al extremo 3' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:40.

PEG2000-C12-

**gggagaggagaagaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c
(F) ggu (F) gc (F) au (F) ac (F) -idT**

- 5 SEC ID NÚM:40-2: Toda la G en la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:40 se modificó con OMe.

**g (M) g (M) g (M) ag (M) ag (M) g (M) ag (M) aag (M) ag (M) g (M) aagu (F) gu (F) gc (F)
ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggu (F) gc (F) au (F) ac (F)**

SEC ID NÚM:40-3: Toda la A en la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:40 se modificó completamente con OMe.

10 **ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) gu (F) gc (F) ac (F) a
ggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggu (F) gc (F) au (F) ac (F)**

SEC ID NÚM:41: se eliminó G5 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:36.

**gggaaggagaagaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggg
u (F) gc (F) ac (F) agu (F) au (F) aag**

- 15 SEC ID NÚM:42: se eliminó A11 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:36.

**gggagaggagagaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggg
u (F) gc (F) ac (F) agu (F) au (F) aag**

SEC ID NÚM:43: se eliminó A17 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:36.

**gggagaggagaagaggagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggg
u (F) gc (F) ac (F) agu (F) au (F) aag**

- 20 SEC ID NÚM:44: se eliminó un par de bases del tallo en el lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:40.

**gggagaggagaagaggaagu (F) u (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F)
F) ggu (F) gc (F) aac (F)**

SEC ID NÚM:45: se eliminaron dos pares de bases del tallo del lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:40.

25 **gggagaggagaagaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gg
gu (F) gc (F) ac (F)**

SEC ID NÚM:45-1: se añadió polietilenglicol con peso molecular de 2000 al extremo 5' mediante el enlazador C12 y se añadió idT al extremo 3' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45.

PEG2000-C12-

**ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu
(F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggu (F) gc (F) ac (F) -idT**

SEC ID NÚM:45-2: toda la A en la parte monocatenaria y toda la G en la parte de bucle en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45 se modificaron completamente con OMe.

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) gc (F) ac (F) agggg (M) u (F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggg (F) gc (F) ac (F)

5 SEC ID NÚM:45-3: toda la A en la parte monocatenaria y todas las A y G en la parte de bucle interno en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45 se modificaron completamente con OMe.

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) gc (F) ac (F) a (M) g (M) gggg (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) g (M) g (M) gu (F) gc (F) ac (F)

SEC ID NÚM:45-4: toda la A en la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' y todas las A y G en la parte del tallo en el lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45 se modificaron completamente con OMe.

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) g (M) c (F) a (M) c (F) agggg (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggg (F) g (M) c (F) a (M) c (F)

10 SEC ID NÚM:45-4-1: toda la G en la parte de bucle del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45-4 se modificó completamente con OMe.

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) u (F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggg (F) g (M) c (F) a (M) c (F)

SEC ID NÚM:45-4-1-1: C24 del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45-4-1 se cambió a nucleótido de RNA.

ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c aggg (M) g (M) u (F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggg (F) g (M) c (F) a (M) c (F)

15 SEC ID NÚM:46: se reemplazó el par de bases A-U con el par de bases G-C en el tallo del lado del extremo del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:40.

gggagaggagaagaggaagu (F) gc (F) gc (F) gc (F) agggg (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggc (F) gc (F) gu (F) ac (F)

SEC ID NÚM:47: se eliminó U32 del bucle del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:40.

gggagaggagaagaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) agggg (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggu (F) gc (F) au (F) ac (F)

20 SEC ID NÚM:48: se eliminó G34 del bucle del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:40.

gggagaggagaagaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) agggg (F) u (F) gu (F) gu (F) c (F) ggu (F) gc (F) au (F) ac (F)

SEC ID NÚM:49: se eliminó U36 del bucle del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:40.

gggagaggagaagaggaagu (F) gu (F) gc (F) ac (F) agggg (F) u (F) ggu (F) c (F) ggu (F) gc (F) au (F) ac (F)

25 SEC ID NÚM:50: se eliminaron G4 y G10 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45.

gggaaggaaagaggaagu (F) gc (F) ac (F) agggg (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggg (F) gc (F) ac (F)

SEC ID NÚM:51: se eliminaron G5 y A11 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:36.

**gggaaggagagaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggg
(F) gc (F) ac (F) agu (F) au (F) aag**

5 SEC ID NÚM:52: se eliminaron G1 y G5 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:36.

**ggaaggagaagaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggg
(F) gc (F) ac (F) agu (F) au (F) aag**

SEC ID NÚM:53: se eliminaron G5 y G10 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:36.

**gggaaggaaagaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggg
(F) gc (F) ac (F) agu (F) au (F) aag**

10 SEC ID NÚM:54: se modificó toda la G con F y toda la A con OMe en la parte monocatenaria del lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45.

**g (F) g (F) g (F) a (M) g (F) a (M) g (F) g (F) a (M) g (F) a (M) a (M) g (F) a (M) g (F) g (F)
) a (M) a (M) gu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggg (F) gc (F)
) ac (F)**

SEC ID NÚM:55: se eliminaron A11 y A12 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45.

15 **gggagaggagaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggg
(F) gc (F) ac (F)**

SEC ID NÚM:56: se eliminaron G13 y A14 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45.

**gggagaggagaaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggg
(F) gc (F) ac (F)**

20 SEC ID NÚM:57: se eliminaron G15 y G16 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45.

**gggagaggagaagaaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggg
(F) gc (F) ac (F)**

SEC ID NÚM:58: se eliminaron A17 y A18 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45.

**gggagaggagaagagggg (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggg
(F) gc (F) ac (F)**

25 SEC ID NÚM:59: se eliminaron 18 nucleótidos de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45, y se añadieron dos G para transcripción. gggg(F)gc(F)ac(F)agggg(F)u(F)ggu(F)gu(F)c(F)ggg(F)gc(F)ac(F) SEC ID NÚM:60: la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45 se cambió a GGGAAGGA.

**gggaaggagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gggg (F) gc (F)
ac (F)**

30 SEC ID NÚM:61: se eliminaron G5, G10, A11, A12, G13 y A14 de la parte monocatenaria en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45.

**gggaaggaggaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggù (F) gu (F) c (F) gggu (F) g
c (F) ac (F)**

SEC ID NÚM:61-1: se modificó G con nucleótido de DNA y se modificó A con OMe en la parte monocatenaria, y G en la parte de bucle se modificó con OMe en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61.

**g (H) g (H) g (H) a (M) a (M) g (H) g (H) a (M) g (H) g (H) a (M) a (M) gu (F) gc (F) ac (F)
aggggu (F) u (F) gggu (F) gu (F) c (F) gggu (F) gc (F) ac (F)**

- 5 SEC ID NÚM:61-2: G y A en la parte monocatenaria y G en la parte de bucle en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 se modificaron con OMe.

**g (M) g (M) g (M) a (M) a (M) g (M) g (M) a (M) g (M) g (M) a (M) a (M) gu (F) gc (F) ac (F)
aggggu (F) u (F) gggu (F) gu (F) c (F) gggu (F) gc (F) ac (F)**

SEC ID NÚM:61-3: alguna parte del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 se modificó con F y OMe.

**g (F) g (F) g (F) a (M) a (M) g (F) g (F) a (M) g (F) g (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F)
) a (M) c (F) a (M) g (F) g (M) g (M) g (M) u (F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) g (F) g (F) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F)**

10

SEC ID NÚM:61-4: alguna parte del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 se modificó con OMe.

**ggga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) u
(F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)**

SEC ID NÚM:61-5: se añadió una cadena de polietilenglicol de 40 kDa ramificada al extremo 5' y se añadió idT al extremo 3' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61-4.

PEG40k-

**ggga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) u
(F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -idT**

15

SEC ID NÚM:61-6: se añadió la cadena de polietilenglicol de 30 kDa a ambos extremos del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61-4.

PEG30k-

**ggga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) u
(F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F) -PEG30k**

20

SEC ID NÚM:61-7: alguna parte del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 se modificó con OMe.

**ggga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) u
(F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) g (M) g (M) gu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)**

SEC ID NÚM:61-8: alguna parte del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 se modificó con OMe.

**ggga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) a (M) g (M) gg (M)
) g (M) u (F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) gggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)**

SEC ID NÚM:61-9: alguna parte del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 se modificó con OMe y se añadió polietilenglicol de 2 kDa al extremo 5'.

PEG2000-

ggga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) a (M) gg (M) g (M)

25

) g (M) u (F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) ggg (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F)

SEC ID NÚM:62: se eliminaron G13, A14, G15, G16, A17 y A18 de la parte monocatenaria del lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45.

**gggagaggagaagu (F) gc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) g
c (F) ac (F)**

- 5 SEC ID NÚM:63: A25 y G26 en el RNA que se indica con la SEC ID NÚM:45 se cambiaron a C para hacer el bucle interno como tallo.

**gggagaggagaagaggaagu (F) gc (F) ac (F) c (F) c (F) ggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F)
c (F) ggggu (F) gc (F) ac (F)**

SEC ID NÚM:64: se eliminó U-A del tallo en el lado del extremo 5' del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61.

**gggaaggaggaaggc (F) ac (F) aggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggggu (F) gc (F)
c (F)**

- 10 SEC ID NÚM:65: A19 y G20 en el bucle interno del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 se reemplazaron con C.

**gggaaggaggaagu (F) gc (F) ac (F) c (F) c (F) ggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) gg
gu (F) gc (F) ac (F)**

SEC ID NÚM:66: alguna parte del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 se modificó con OMe, y G se modificó con F.

**g (F) g (F) a (M) a (M) g (F) g (F) a (M) g (F) g (F) a (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M)
) c (F) a (M) gg (M) g (M) g (M) u (F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) g (F) g (F) g
15 (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F)**

SEC ID NÚM:67: se cambió la modificación del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:66.

**gga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) u (
F) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) ggggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)**

SEC ID NÚM:68: alguna parte del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 se modificó con OMe y se reemplazó U28 con A(M).

- 20 **ggga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) u
(F) u (F) g (M) g (M) a (M) g (M) u (F) c (F) ggggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)**

SEC ID NÚM:69: alguna parte del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 se modificó con OMe, y U25 se reemplazó con A(M).

**ggga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) u
(F) a (M) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) ggggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)**

- 25 SEC ID NÚM:70: alguna parte del RNA que se indica con la SEC ID NÚM:61 se modificó con OMe y U24 se reemplazó con A(M).

**ggga (M) a (M) gga (M) gga (M) a (M) g (M) u (F) g (M) c (F) a (M) c (F) aggg (M) g (M) a
(M) u (F) g (M) g (M) u (F) g (M) u (F) c (F) ggggu (F) g (M) c (F) a (M) c (F)**

Aquí, n(M) representa ribosa modifica con OMe en la posición 2', n(F) representa ribosa modificada con F en la posición 2', n(H) representa desoxirribosa, PEG2000 representa un polietilenglicol de 2000-Da, PEG40k representa un polietilenglicol ramificado de 40kDa, PEG30k representa un polietilenglicol de 30kDa, C12 representa un enlazador C12 e idT representa dT invertido.

30

Se realizó un experimento sobre la inhibición de migración celular para pleiotrofina por el aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:5 y sus formas alteradas. El método experimental se describió anteriormente, excepto que se usó pleiotrofina en lugar de midkina. La concentración de aptámero fue 100 nM, y la actividad inhibidora del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:5 contra midkina se tomó como 100. Como resultado del experimento, la actividad inhibidora contra pleiotrofina fue 13 (Tabla 4-1). Ésta es la media para 6 mediciones. En las formas alteradas, no se observó una actividad inhibidora destacada contra pleiotrofina.

Se examinó la actividad inhibidora de migración celular del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:35 contra midkina de ratón. El experimento fue el mismo que en el método experimental anteriormente descrito, que usa midkina humana. Como resultado del experimento, el % de actividad inhibidora de este aptámero fue 84%. Por ende, se descubrió que este aptámero posee una actividad contra midkina de ratón equivalente a la actividad inhibidora contra midkina humana.

Usando tRNA (fabricado por Sigma), Trombina-S y VIH-S, que es muy poco probable que se unan específicamente a midkina, en lugar de aptámeros, se realizó un experimento de inhibición de la migración celular para midkina humana, como se describió anteriormente. Aquí, la Trombina-S es un aptámero de DNA de `t'ggttggtggtgg'aaaaaaaaaaaaaaaa` (SEC ID NÚM:74), y VIH-S es un aptámero de DNA de `g'tggggggtggggg't` (SEC ID NÚM:75). Cada `''''` representa un enlace fosforotioato. Los enlaces fosforotioato se añadieron con el fin de aumentar la resistencia a la nucleasa. Estos RNA se utilizaron a 500 nM. Cuando la actividad inhibidora del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:45 contra midkina humana se tomó como 100, la actividad de tRNA se determinó en 28, La trombina-S fue 0 y VIH-S 48. En consecuencia, se sugirió que los aptámeros preparados en el presente estudio podrían unirse específicamente a importantes sitios asociados con actividad de migración celular de midkina.

El aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:5, que tenía 77 nucleótidos de longitud, pudo miniaturizarse a 39 nucleótidos, sin reducir en gran medida la actividad (SEC ID NÚM:61). La porción monocatenaria en el extremo 5' no pudo eliminarse totalmente; se presupone que la porción monocatenaria está implicada en la formación de la estructura estérica del aptámero. Si bien G de esta porción monocatenaria puede ser un nucleótido modificado en F, se descubrió que la actividad se redujo en el caso de nucleótidos modificados con OMe (SEC ID NÚM:40-2, 54, 61-2). Mientras tanto, incluso cuando A fue un nucleótido modificado con OMe, la actividad permaneció inalterada (SEC ID NÚM:40-3). Incluso cuando algún par de bases A-U se reemplazó con los pares de bases G-C en el tallo del lado del extremo 5', la actividad no estuvo muy influenciada (SEC ID NÚM:46). Incluso cuando A y G de esta porción del tallo se reemplazaron con un nucleótido modificado con OMe, se retuvo la actividad (SEC ID NÚM:45-4). Incluso cuando la porción de bucle interno se reemplazó con una estructura de tallo G-C por sustitución nucleotídica, la actividad no cambió (SEC ID NÚM:63); no obstante, cuando la porción monocatenaria se acortó, la actividad se redujo (SEC ID NÚM:59). Cuando G y A del bucle interno se reemplazaron con un nucleótido modificado con OMe, se redujo la actividad (SEC ID NÚM:45-3). Cuando la porción de bucle estuvo limitada de 1 nucleótido, la actividad disminuyó (SEC ID NÚM:47 to 49). Incluso cuando la G de la porción de bucle se reemplazó con un nucleótido modificado con OMe, se retuvo la actividad (SEC ID NÚM:45-2).

A partir de lo antedicho, se descubrió que la actividad de este aptámero obtenido no fue influenciada sustituyendo algunas bases o cambiando la modificación. Se halló que este aptámero se unió específicamente a midkina para inhibir la actividad de migración celular. A su vez, se descubrió que este aptámero también se unió a la proteína de la familia de pleiotrofina, pero no tuvo una actividad inhibidora de migración celular destacada.

Ejemplo 8

Efecto inhibidor del aptámero sobre adhesión de un órgano usando el modelo de formación posoperatoria de adhesión de ratón

Se abre el abdomen de un ratón normal, y se realiza una incisión en el peritoneo con un bisturí o similar, después de lo cual los órganos se secan y se sutura la parte laparotomizada; al cabo de 5 días, se puede observar la adhesión del órgano (Am J Obstet Gynecol 179, 438-443, 1998). Se describe que cuando los ratones con genes inactivados de midkina se trataron usando este método para causar adhesión posoperatoria del órgano, la adhesión posoperatoria del órgano no ocurrió (Biochemical and Biophysical Research Communication, 317, 108-113, 2004). En consecuencia, con el uso del modelo de formación de adhesión posoperatoria de ratón se investigó el efecto que previene la adhesión posoperatoria del órgano del aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:76. Bajo anestesia, se sometió a laparotomía a un ratón C57BL/6 de ocho semanas de vida (hembra), después de lo cual se limpió el peritoneo con algodón absorbente. Después, se realizó una fisura de aproximadamente 2 cm en el peritoneo en cinco posiciones, usando una tijera. Después de la hemostasis con algodón absorbente durante 10 minutos, la herida se suturó usando hilo y aguja de costura. Después de la emergencia, el aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:76 se administró por vía intraperitoneal en una dosis de 1 mg/25 ml/kg. Para un grupo control, se administró disolución salina que contenía MgCl₂ 1 mM por vía intraperitoneal en una dosis de 25 ml/kg de la misma manera. La administración tuvo lugar una vez al día en un total de tres veces en el día 0, día 1 y día 2 posoperatorio, luego el animal se laparotomizó bajo anestesia en el día 3, y se evaluó el grado de adhesión del órgano a la herida usando los criterios que se indican a continuación.

0: sin adhesión

1: con adhesión, adhesión leve (leve)

2: con adhesión, adhesión moderada (moderada)

3: con adhesión, adhesión intensa que no puede desprenderse incluso arrastrando el órgano en la porción adherida (intensa)

5 Los resultados se exponen como las medias y los errores estándar de puntuaciones del grado de adhesión para 9 a 10 animales en cada grupo (Tabla 5). Como resultado, la puntuación fue 3 en todos los animales del grupo que recibió disolución salina fisiológica, mientras que la puntuación media del grupo que recibió el aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:76 fue 2,4. En el grupo que recibió el aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:76, en comparación con el grupo que recibió disolución salina fisiológica, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Para el procesamiento estadístico, se utilizó la prueba de la U de Mann-Whitney. A partir de los resultados mencionados anteriormente, se demostró que el aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:76 tuvo actividad preventiva de adhesión posoperatoria del órgano.

10 El aptámero que se indica con la SEC ID NÚM:76 es el siguiente. SEC ID NÚM:76: el RNA se indica con la SEC ID NÚM:40, en donde toda las "A" de la porción monocatenaria del extremo 5' se modifican con OMe, con colesterol (Chol) añadido al extremo 5' mediante un enlazador de cadena hidrocarbonada saturada (C12) que tiene 12 átomos de carbono, y dT invertido (idT) añadido al extremo 3'.

Chol-C12-

**ggga (M) ga (M) gga (M) ga (M) a (M) ga (M) gga (M) a (M) gu (F) gu (F) gc (F) ac (F) a
ggggu (F) u (F) ggu (F) gu (F) c (F) ggu (F) gc (F) au (F) ac (F) -idT**

[Tabla 5]

Resultados del experimento de inhibición de adhesión del órgano que utiliza modelo de ratón	
Administración	Puntuación
Disolución salina fisiológica	3,0 +/- 0,0
SEC ID NÚM:76	2,4 +/- 0,3*
*: $p < 0,05$ prueba de la U de Mann-Whitney	

20 La presente solicitud se basa en la solicitud de patente núm. 2006-308482 presentada en Japón (fecha de presentación: 14 de noviembre de 2006).

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> RIBOMIC INC.	
	<120> APTÁMERO CONTRA MIDKINA Y USO DEL MISMO	
	<130> 091160	
5	<150> JP 2006-308482 <151> 2006-11-14	
	<160> 76	
	<170> PatentIn versión 3.3	
10	<210> 1 <211> 77 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> Aptámero para midkina	
15	<400> 1	
	gggagaggag aagaggaaau aguaaagggu gaauugcga aagcuuuuu agucgcagua	60
	gaggacagga augagga	77
	<210> 2 <211> 77 <212> RNA <213> Artificial	
20	<220> <223> Aptámero para midkina	
	<400> 2	
	gggagaggag aagaggaaag acuaaguaag agaacaccgg aaugaaggga cuuacgugua	60
	gaggacagga augagga	77
25	<210> 3 <211> 75 <212> RNA <213> Artificial	
	<220> <223> Aptámero para midkina	
30	<400> 3	
	gggagaggag aagaggaaag ccuucuaccg aaagugggaa agcacacaua aaucugguag	60
	aggacaggaa ugaga	75
	<210> 4 <211> 76 <212> RNA <213> Artificial	
35	<220> <223> Aptámero para midkina	
	<400> 4	
	gggagaggag aagaggaaacg ugcucuguac gaggaguagc cggaaagaag gcggugugua	60
40	gaggacagga augaga	76

	<210> 5		
	<211> 76		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 5		
	gggagaggag aagaggaagu ggcacaggg guuggugcg ggugcauaca guauaagaua	60	
	gaggacagga augaga	76	
10	<210> 6		
	<211> 67		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
15	<400> 6		
	gggagaggag aagaggaacg ugcucuguac gaggaguagc cggaaagaag gcggugugua	60	
	gaggaca	67	
20	<210> 7		
	<211> 64		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 7		
	gggaacgugc ucuguacgag gaguagccgg aaagaaggcg guguguagag gacaggaaug	60	
	agga	64	
25	<210> 8		
	<211> 69		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 8		
	gggagaggag aagaggaacg cuguacgagg aguagccgga aagaaggcgg uguaguagcag	60	
	gaauagagga	69	
35	<210> 9		
	<211> 66		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 9		
	gggagaggag aagaggaacg ugcuuguac gccggaaaga agguguguag aggacaggaa	60	
40	ugagga	66	

	<210> 10		
	<211> 73		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 10		
	gggagaggag aagaggaacg ugcucuguac gaggaguagc cgaaaggcgg uguguagagg	60	
	acaggaauga gga	73	
10	<210> 11		
	<211> 77		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
15	<400> 11		
	gggagaggag aagaggaacg ugcucugcac gaggaguagc cggaaagaag gcggcgugca	60	
	gaggacagga augagga	77	
20	<210> 12		
	<211> 58		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 12		
	gggagaggag aagaggaacg cugcagcagg aguagccgga aagaaggcgg cgugcagc	58	
25	<210> 13		
	<211> 50		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 13		
	gggagaggaa cgcugcacga ggaguagccg gaaagaaggc ggcgugcagc	50	
35	<210> 14		
	<211> 54		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 14		
40	gggagaggag aagaggaacg cuacgaggag uagccgaaa gaaggcggcg uagc	54	
	<210> 15		
	<211> 56		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		

ES 2 397 715 T3

	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 15	
	gggagaggag aagaggaacg cugcacgagg aguagccgga aagggcgcg ugcagc	56
5	<210> 16	
	<211> 57	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 16	
	gggagaggag aagaggaacg cugcacgagg guagccgga agaagggcg ggcagc	57
	<210> 17	
	<211> 46	
15	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 17	
20	gggagaggaa cgcucgagg aguagccgga aagaagggcg cguagc	46
	<210> 18	
	<211> 37	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 18	
	gggcuacgag gaguagccgg aaagaagggcg gcuagc	37
	<210> 19	
30	<211> 44	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
35	<400> 19	
	gggagaggaa cguacgagga guagccgga agaagggcg guac	44
	<210> 20	
	<211> 42	
	<212> RNA	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 20	
	gggagaggaa cgacgaggag uagccgaaa gaagggcg uc	42
45	<210> 21	
	<211> 44	
	<212> RNA	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 21	
5	gggagaggaa cgcuacgagg aguagcggaa agaagcggcg uagc	44
	<210> 22	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 22	
	gggacgagga guagccggaa agaaggcggc guc	33
	<210> 23	
15	<211> 38	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
20	<400> 23	
	gggagaggaa cgacgaggag uagccgaaag gcggcguc	38
	<210> 24	
	<211> 38	
	<212> RNA	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 24	
	gggagaggaa cgacgaggag uagccuucgg gcggcguc	38
30	<210> 25	
	<211> 41	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 25	
	gggagaggaa cgacgagaac agccgaaag aaggcggcgu c	41
	<210> 26	
	<211> 41	
40	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 26	
45	gggagaggaa cgacgagagu agccgaaag aaggcggcgu c	41
	<210> 27	

	<211> 41	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 27	
	gggagaggaa cgacgagggg agccggaag aaggcggcgu c	41
	<210> 28	
	<211> 31	
10	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 28	
15	ggcgaggagu agccggaag aaggcggcgc c	31
	<210> 29	
	<211> 31	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 29	
	gacgaggagu agccggaag aaggcggcgu c	31
	<210> 30	
25	<211> 71	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
30	<400> 30	
	ggagaagagg aagugugcac agggguggu gucggugca uacaguauaa gauagaggac	60
	aggaugagg a	71
	<210> 31	
	<211> 67	
	<212> RNA	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 31	
	gggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guugugugc ggugcauaca guauaagaua	60
	gaggaca	67
40	<210> 32	
	<211> 57	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> Aptámero para midkina	

	<400> 32	
	gggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauaca guauaag	57
	<210> 33	
	<211> 61	
5	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 33	
	ggagaagagg aagugugcac agggguuggu gucgggugca uacaguauaa gauagaggac	60
10	a	61
	<210> 34	
	<211> 46	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 34	
	ggaggaagug ugcacagggg uggugucgg gugcauacag uauaag	46
	<210> 35	
20	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
25	<400> 35	
	gggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauaca g	51
	<210> 36	
	<211> 53	
30	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220> _	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 36	
	gggagaggag aagaggaagu gcacaggggu uggugucggg ugcacaguau aag	53
35	<210> 37	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 37	
	gggagaggag aagaggaagc acagggguug gugucgggug caguauaag	49
	<210> 38	
	<211> 57	
45	<212> DNA	
	<213> Artificial	

ES 2 397 715 T3

	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 38		
	ggguuuuuuu uuuuuuuugu gugcacaggg guuggugucg ggugcauaca guauaag		57
5	<210> 39		
	<211> 45		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
10	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 39		
	gggagaggag aagaggaagg cacagggguu ggugucgggu gccag		45
	<210> 40		
	<211> 49		
15	<212> RNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 40		
20	gggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauac		49
	<210> 41		
	<211> 52		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 41		
	gggaaggaga agaggaagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag		52
	<210> 42		
30	<211> 52		
	<212> RNA		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
35	<400> 42		
	gggagaggag agaggaagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag		52
	<210> 43		
	<211> 52		
	<212> DNA		
40	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aptámero para midkina		
	<400> 43		
	gggagaggag aagaggagug cacagggguu ggugucgggu gcacaguaua ag		52
45	<210> 44		
	<211> 47		
	<212> RNA		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 44	
5	gggagaggag aagaggaagu ugcacagggg uggugucgg gugcaac	47
	<210> 45	
	<211> 45	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 45	
	gggagaggag aagaggaagu gcacaggggu uggugucgg ugcac	45
	<210> 46	
15	<211> 49	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
20	<400> 46	
	gggagaggag aagaggaagu gcgcgaggg guuggucgc ggcgcguac	49
	<210> 47	
	<211> 48	
	<212> RNA	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 47	
	gggagaggag aagaggaagu ggcacaggg guugucgcg gugcauac	48
30	<210> 48	
	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 48	
	gggagaggag aagaggaagu ggcacaggg guugucgcg gugca	48
	<210> 49	
	<211> 48	
40	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 49	
45	gggagaggag aagaggaagu ggcacaggg guuggucgcg gugcauac	48
	<210> 50	

	<211> 43	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 50	
	gggaaggaaa gaggaagugc acagggguug gugucgggug cac	43
	<210> 51	
10	<211> 51	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 51	
15	gggaaggaga gaggaagugc acagggguug gugucgggug cacaguauaa g	51
	<210> 52	
	<211> 51	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 52	
	ggaaggagaa gaggaagugc acagggguug gugucgggug cacaguauaa g	51
25	<210> 53	
	<211> 51	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
30	<400> 53	
	gggaaggaaa gaggaagugc acagggguug gugucgggug cacaguauaa g	51
	<210> 54	
	<211> 45	
35	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 54	
	gggagaggag aagaggaagu gcacaggggu uggugcggg ugcac	45
40	<210> 55	
	<211> 43	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 55	
	gggagaggag gaggaagugc acagggguug gugucgggug cac	43

	<210> 56	
	<211> 43	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 56	
	gggagaggag aaggaagugc acaggggwg gugucgggug cac	43
10	<210> 57	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
15	<400> 57	
	gggagaggag aagaaagugc acaggggwg gugucgggug cac	43
	<210> 58	
	<211> 43	
	<212> RNA	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 58	
	gggagaggag aagagggugc acagggguug gugucgggug cac	43
25	<210> 59	
	<211> 29	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 59	
	gggugcacag ggguggugu cgggugcac	29
	<210> 60	
	<211> 35	
35	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 60	
40	gggaaggagu gcacaggggu uggugucggg ugcac	35
	<210> 61	
	<211> 39	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 61	

	gggaaggagg aagugcacag gguuggugu cgggugcac	39
	<210> 62	
	<211> 39	
5	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 62	
	gggagaggag aagugcacag gguuggugu cgggugcac	39
10	<210> 63	
	<211> 45	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 63	
	gggagaggag aagaggaagu gcacccgggu uggugucggg ugcac	45
	<210> 64	
	<211> 37	
20	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 64	
25	gggaaggagg aagcacag gguugguguc gggugcc	37
	<210> 65	
	<211> 39	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 65	
	gggaaggagg aagugcaccc gguuggugu cgggugcac	39
	<210> 66	
35	<211> 38	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
40	<400> 66	
	ggaaggagga agugcacag gguugguguc gggugcac	38
	<210> 67	
	<211> 38	
	<212> RNA	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	

	<400> 67	
	ggaaggagga agugcacagg gguugguguc gggugcac	38
	<210> 68	
	<211> 39	
5	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 68	
10	gggaaggagg aagugcacag gguuggagu cggugcac	39
	<210> 69	
	<211> 39	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 69	
	gggaaggagg aagugcacag gguuggagu cggugcac	39
	<210> 70	
20	<211> 39	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
25	<400> 70	
	gggaaggagg aagugcacag gguuggagu cggugcac	39
	<210> 71	
	<211> 77	
	<212> DNA	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> molde de DNA para producir el aptámero para midkina	
	<220>	
	<221> característica_misc	
35	<223> n es a, c, g o t	
	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (20).. (59)	
	<223> n es a, c, g, o t	
40	<400> 71	
	
	tcctcattcc tgcctctctan nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	60
	tcctctctcc ctctccc	77
	<210> 72	
	<211> 35	
	<212> DNA	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador para producir el aptámero para midkina	

	<400> 72	
	taatacgact cactataggg agaggagaag aggaa	35
	<210> 73	
	<211> 19	
5	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso para producir el aptámero para midkina	
	<400> 73	
10	tcctcattcc tgcctcta 19	
	<210> 74	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> aptámero de DNA para trombina (Trombina-S)	
	<400> 74	
	tggttggtgt ggttggtaaa aaaaaaaaaaaa aaa	33
	<210> 75	
20	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> aptámero de DNA para VIH (VIH-S)	
25	<400> 75	
	gtggtgggtg ggtgggt 17	
	<210> 76	
	<211> 49	
	<212> RNA	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Aptámero para midkina	
	<400> 76	
	gggagaggag aagaggaagu gugcacaggg guuggugucg ggugcauac	49
35		

REIVINDICACIONES

1. Un aptámero que posee actividad inhibidora contra midkina, que es o bien (a) o (b) a continuación:

5 (a) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las SEC ID NÚM: 1 a 2, 4 a 20, 22 a 33, 35 a 36, 39 a 64 y 66 a 70, con la salvedad que el uracilo puede ser timina, en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que,

(i) las posiciones 2' de los nucleótidos de pirimidina, ya sean idénticos o diferentes, son átomos de flúor o están sustituidas por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en átomos de hidrógeno, grupos hidroxilo y grupos metoxi, y

10 (ii) las posiciones 2' de los nucleótidos de purina, ya sean idénticos o diferentes, son grupos hidroxilo o están sustituidas por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en átomos de hidrógeno, grupos metoxi y átomos de flúor;

15 (b) un aptámero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las SEC ID NÚM: 1 a 2, 4 a 20, 22 a 33, 35 a 36, 39 a 64 y 66 a 70, con la salvedad que el uracilo puede ser timina, en donde uno a tres nucleótidos están sustituidos, eliminados, insertados o añadidos, en donde los nucleótidos contenidos en el aptámero son tales que,

(i) las posiciones 2' de los nucleótidos de pirimidina, ya sea idénticos o diferentes, son átomos de flúor o están sustituidas por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en átomos de hidrógeno, grupos hidroxilo y grupos metoxi, y

20 (ii) las posiciones 2' de los nucleótidos de purina, ya sea idénticos o diferentes, son grupos hidroxilo o están sustituidas por átomos o grupos seleccionados del grupo que consiste en átomos de hidrógeno, grupos metoxi y átomos de flúor.

2. El aptámero según la reivindicación 1, en el que un nucleótido contenido en el aptámero está modificado.

3. Un complejo que comprende el aptámero según la reivindicación 1 o 2 y una sustancia funcional.

25 4. El complejo según la reivindicación 3, en el que la sustancia funcional es una sustancia de afinidad, una sustancia para etiquetado, una enzima, un vehículo para administración de un fármaco o un fármaco.

5. Un fármaco que comprende el aptámero según la reivindicación 1 o 2, o el complejo según la reivindicación 3 o 4.

6. Un inhibidor de migración celular que comprende el aptámero según la reivindicación 1 o 2, o el complejo según la reivindicación 3 o 4.

30 7. Un reactivo diagnóstico que comprende el aptámero según la reivindicación 1 o 2, o el complejo según la reivindicación 3 o 4.

8. Un agente de etiquetado que comprende el aptámero según la reivindicación 1 o 2, o el complejo según la reivindicación 3 o 4.

9. Un método *in vitro* para detectar midkina, que utiliza el aptámero según la reivindicación 1 o 2, o el complejo según la reivindicación 3 o 4.

FIG. 1B

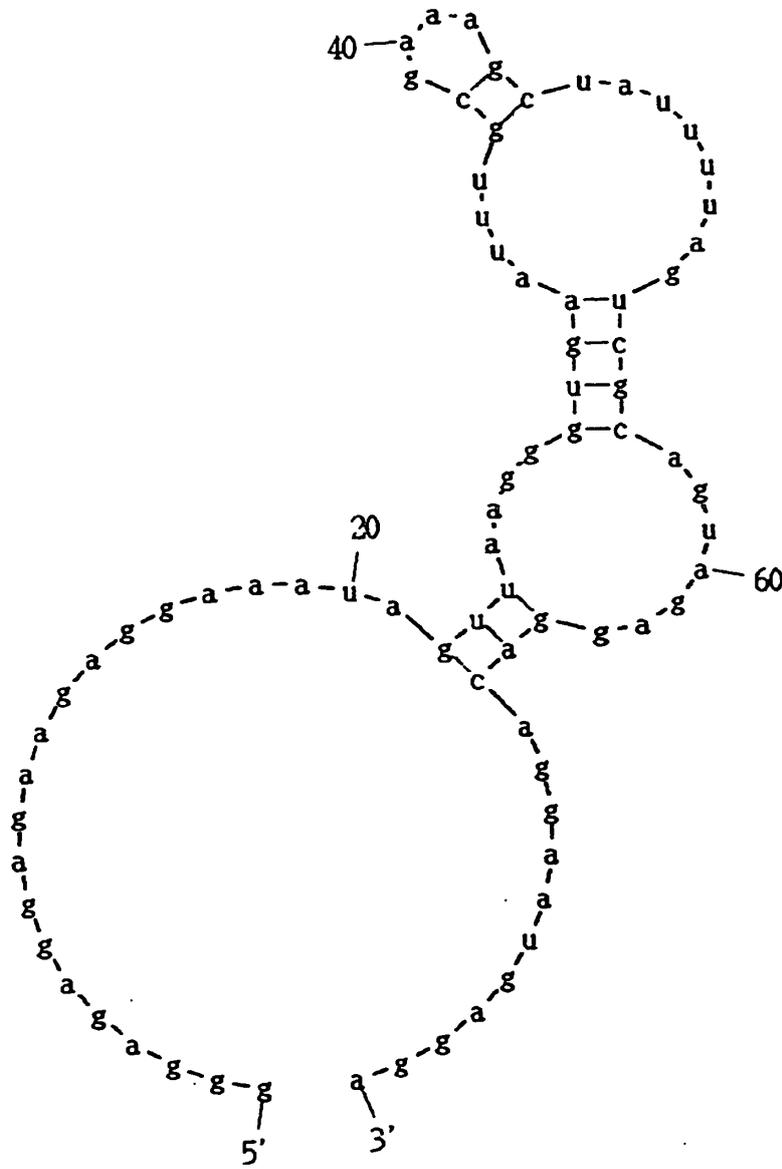


FIG. 3A

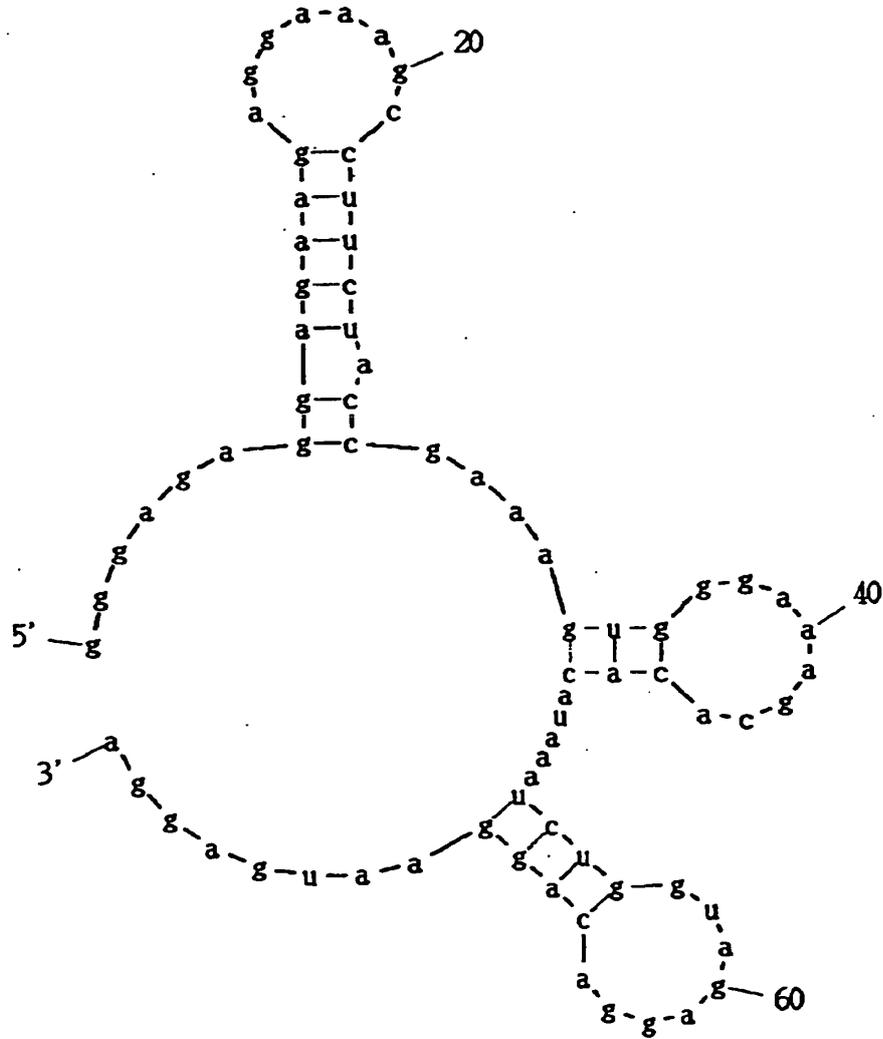


FIG. 3B

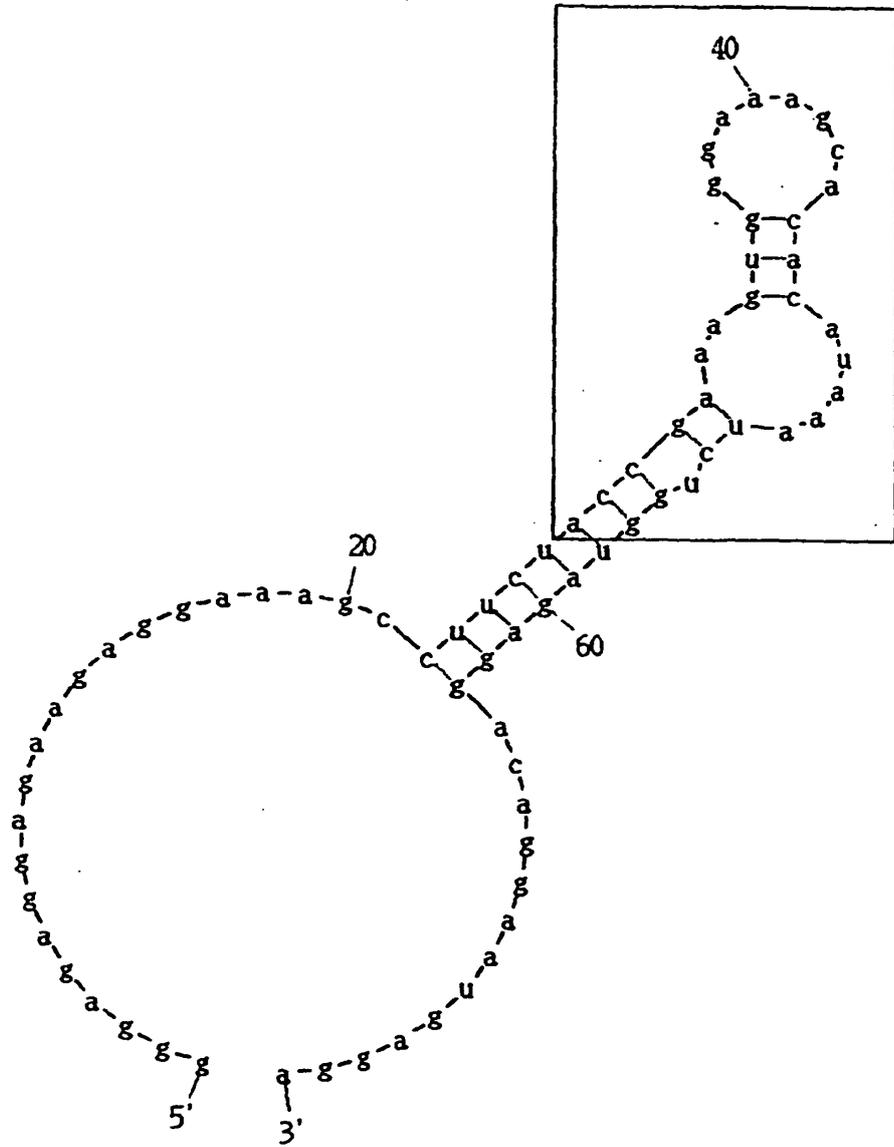


FIG. 6

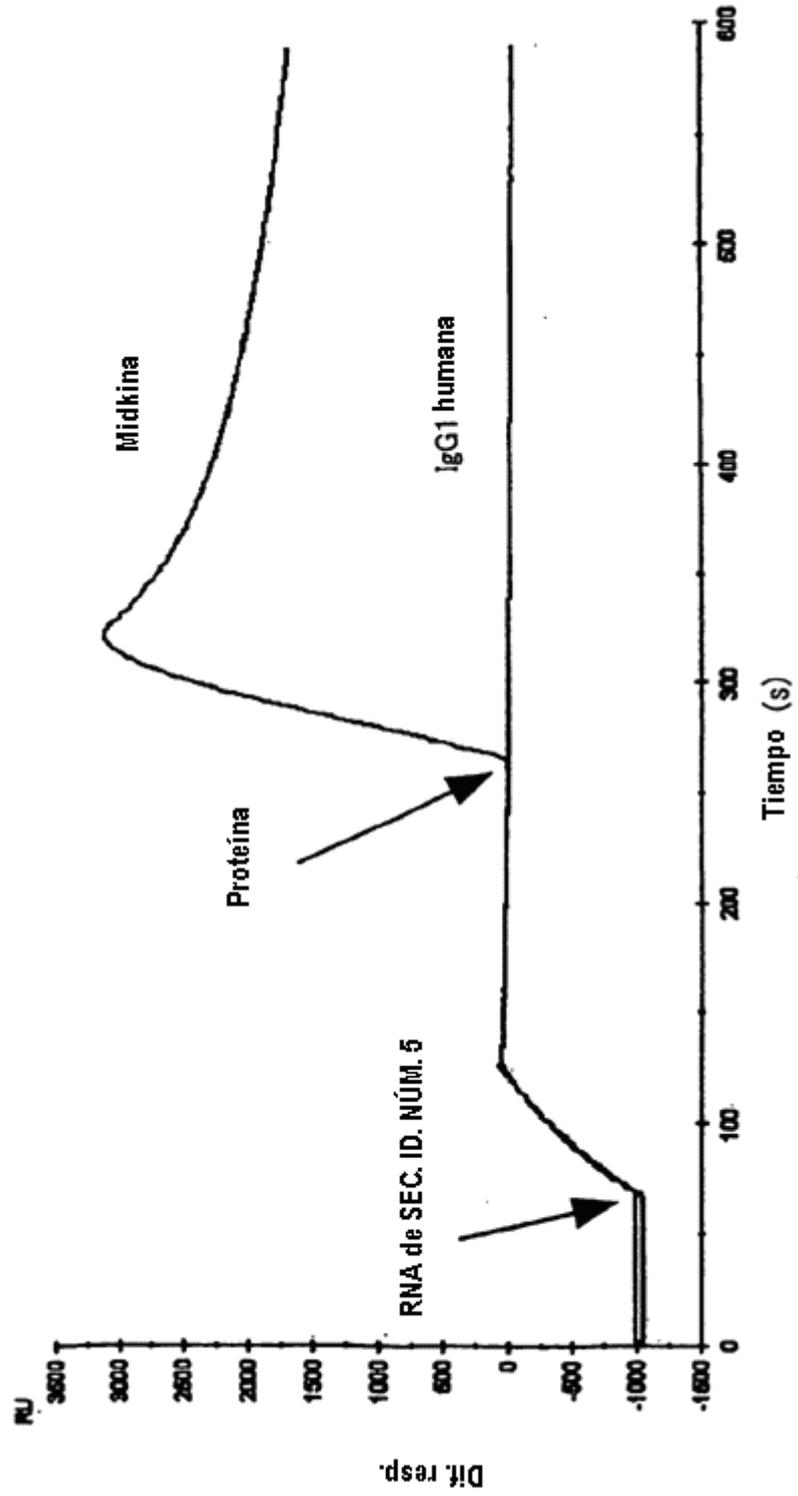


FIG. 7

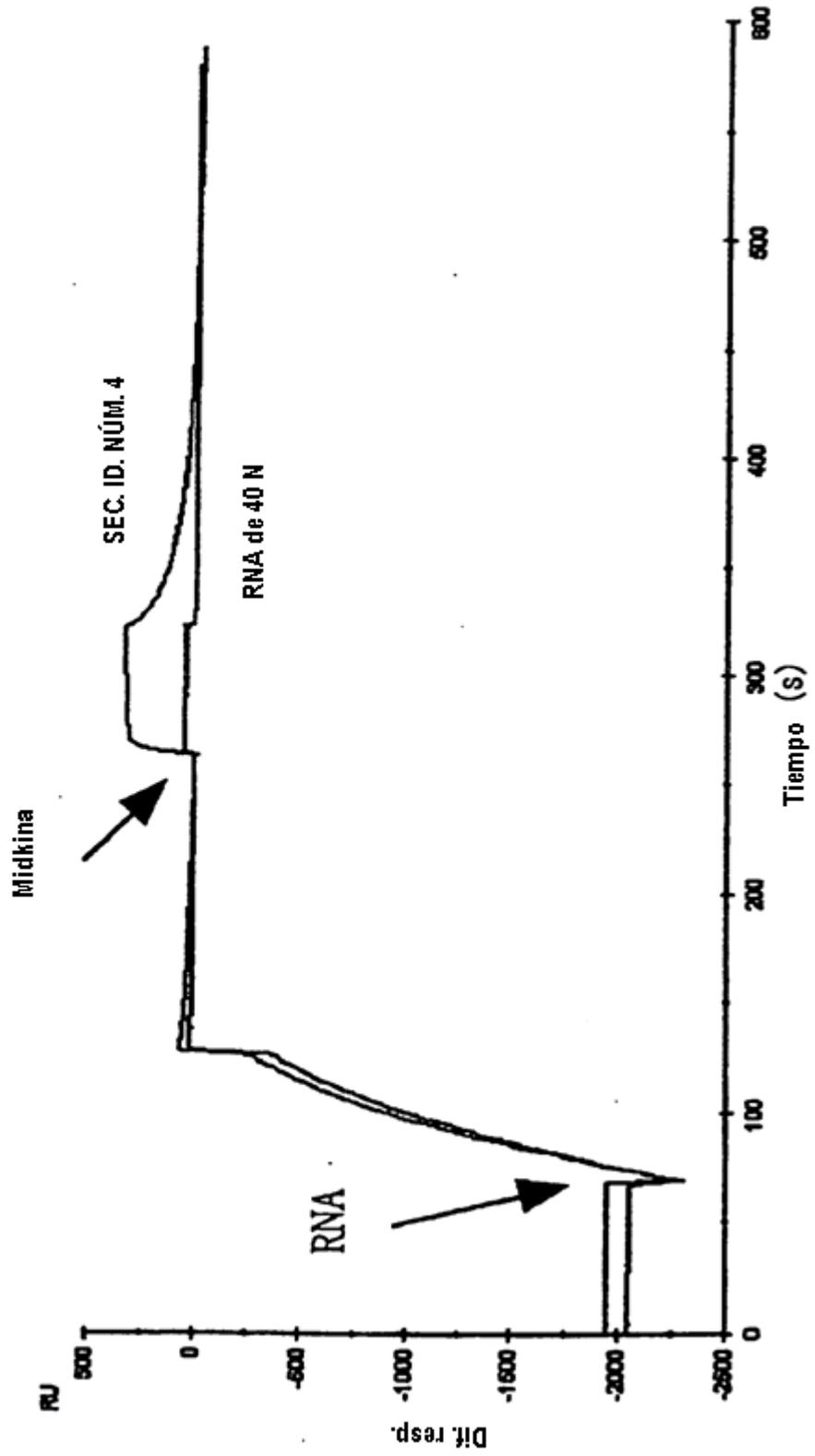


FIG. 8.

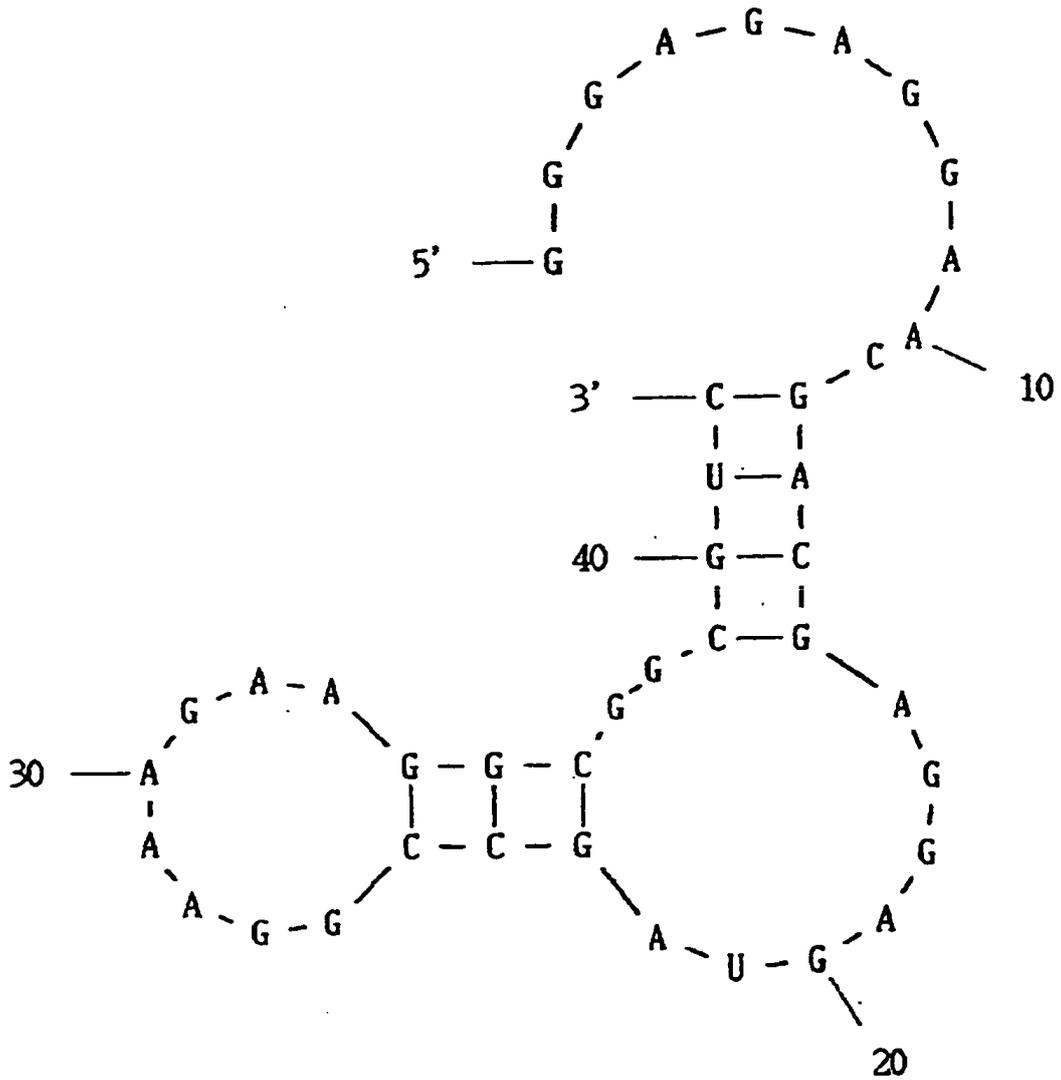


FIG. 9

